

Testo di riferimento

Metodologia biochimica

A cura di Keith Wilson, John Walker

Tecniche elettroforetiche

- Elettroforesi deriva da elettrico dal latino scientifico “electricus” e da foresi dal greco phoresis, “trasporto”
- La prima metodica elettroforetica è stata definita **elettroforesi in fase libera**

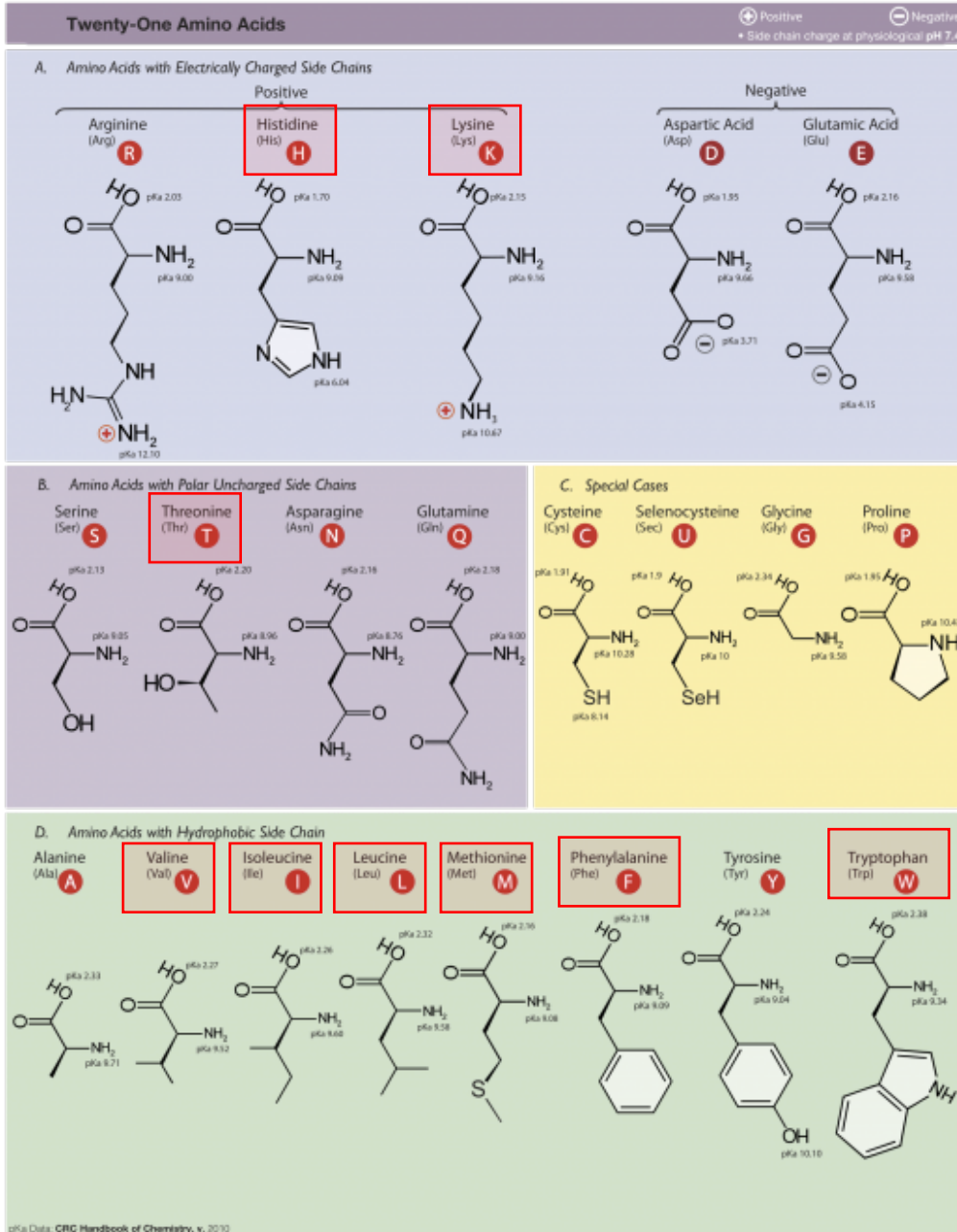
Principio

- Migrazione, attraverso un mezzo liquido e/o solido, e sotto l'impulso di un campo elettrico, di particelle dotate di cariche, ioni o polielettroliti

Tecniche elettroforetiche

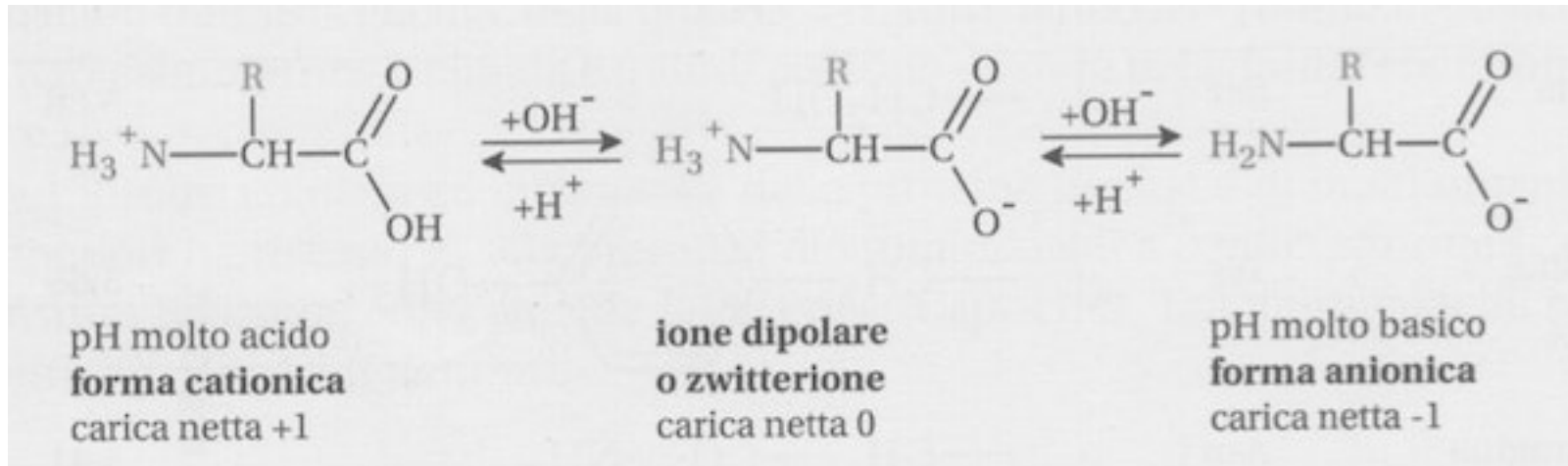
- ✓ Molte molecole biologiche (aa, peptidi, proteine, DNA RNA) possiedono gruppi ionizzabili e, quindi, ad un opportuno valore di pH, sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche
- ✓ Sotto l'influenza di un campo elettrico queste molecole cariche migrano verso il catodo (+) o l'anodo (-), a seconda che possiedano una carica positiva (cationi) o negativa (anioni)
- ✓ Si distinguono, in generale, metodi frontali, in cui la separazione avviene in soluzione libera, e metodi zionali, che si avvalgono dell'utilizzo di mezzi solidi, porosi ed inerti, come carta, gel o acetato di cellulosa

Amminoacidi



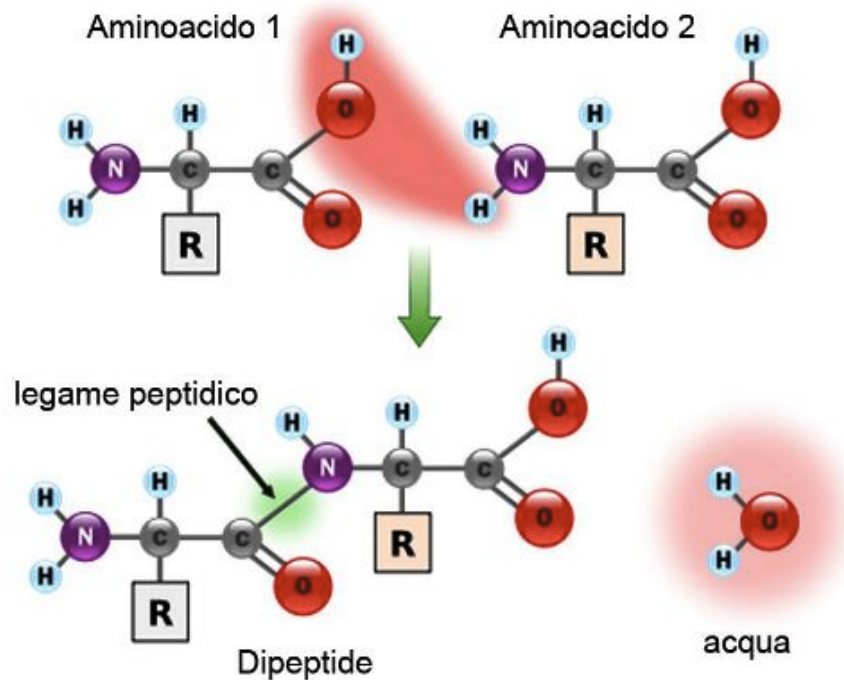
- Molecole che contengono un gruppo $-NH_2$ e $-COOH$ legati allo stesso C (α)
- 20 amminoacidi negli organismi
- 9 essenziali: il corpo umano non può sintetizzarli
- Gruppi laterali: legati ad altri C
- A seconda del pH i gruppi possono essere ionizzati o neutri (zwitternioni)

Amminoacidi



- Il pH in cui l'amminoacido si trova con carica 0, ma in forma dipolare (zwitterione), si chiama **punto isoelettrico**.
- Per un amminoacido contenente solo un gruppo ---COOH e un gruppo ---NH_2 come, ad esempio, la glicina caratterizzato da una $\text{pK}_{\text{a}1}$ e una $\text{pK}_{\text{a}2}$ relative all'acido carbossilico e al gruppo amminico, il punto isoelettrico è dato dalla media dei pK
- Nel caso in cui la catena R presenti un ulteriore gruppo acido ionizzabile, come nel caso dell'acido aspartico, vi è una terza costante di dissociazione $\text{pK}_{\text{a}3}$
- Per il p.i, bisogna però considerare unicamente i pKa dei gruppi, carbossilici o amminici, maggiormente presenti, per l'aspartato il pKa dei due gruppi carbossilici
- ASPARTATO $\text{pK}_{\text{a}1} = 1.88$ carbossilico in α , $\text{pK}_{\text{a}2} = 9.60$ gruppo amminico in α
 $\text{pK}_{\text{a}3} = 3.65$ carbossilico catena laterale $1.88 + 3.65/2 = 2.77$ p.i

Amminoacidi



- Per eliminazione di una molecola di acqua il gruppo amminico di un amminoacido può legarsi al gruppo carbossilico di un altro: *legame peptidico*
- Il dipeptide si allunga reagendo nella stessa maniera con altri AA
- Lunghe catene: polipeptidi

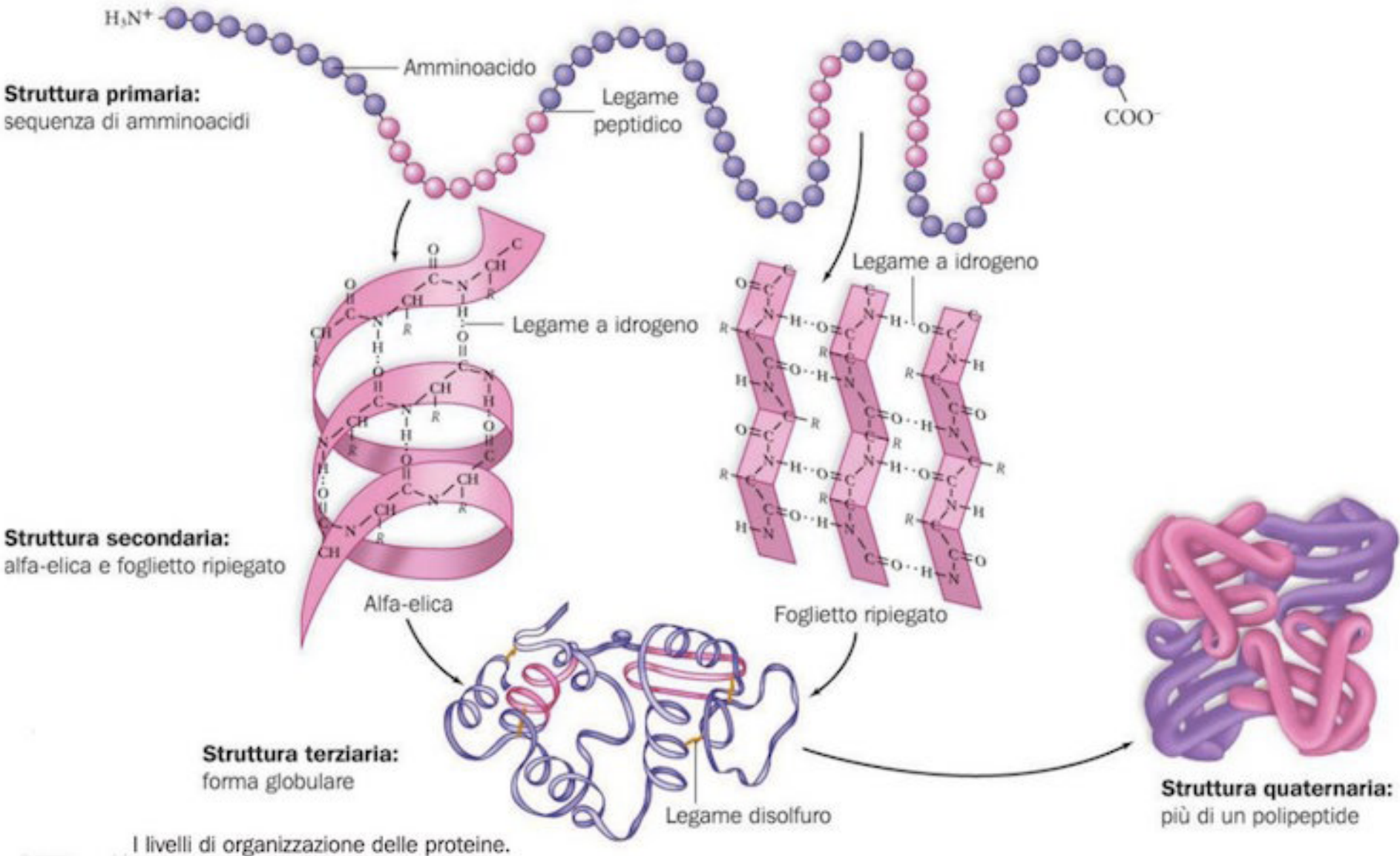
Proteine

- Macromolecola formata da una a più lunga catena polipeptidica
- Svolgono diverse attività negli organismi: enzimi, reazioni cataboliche e metaboliche...

Livelli organizzazione proteine

- **Primaria:** sequenza specifica degli amminoacidi
- **Secondaria:** ripetizione regolare di strutture locali stabilizzate da legami idrogeno, α elica, β foglietto
- **Terziaria:** struttura 3D. Interazione spaziale di una struttura secondaria con un'altra. La terziaria è stabilizzata da interazioni come Van der Waals, legami H o ponti disolfuro.
- **Quaternaria:** associazione di due o più unità polipeptidiche, unite tra loro da legami deboli es. emoglobina

Proteine



Punto isoelettrico polipeptidi e proteine

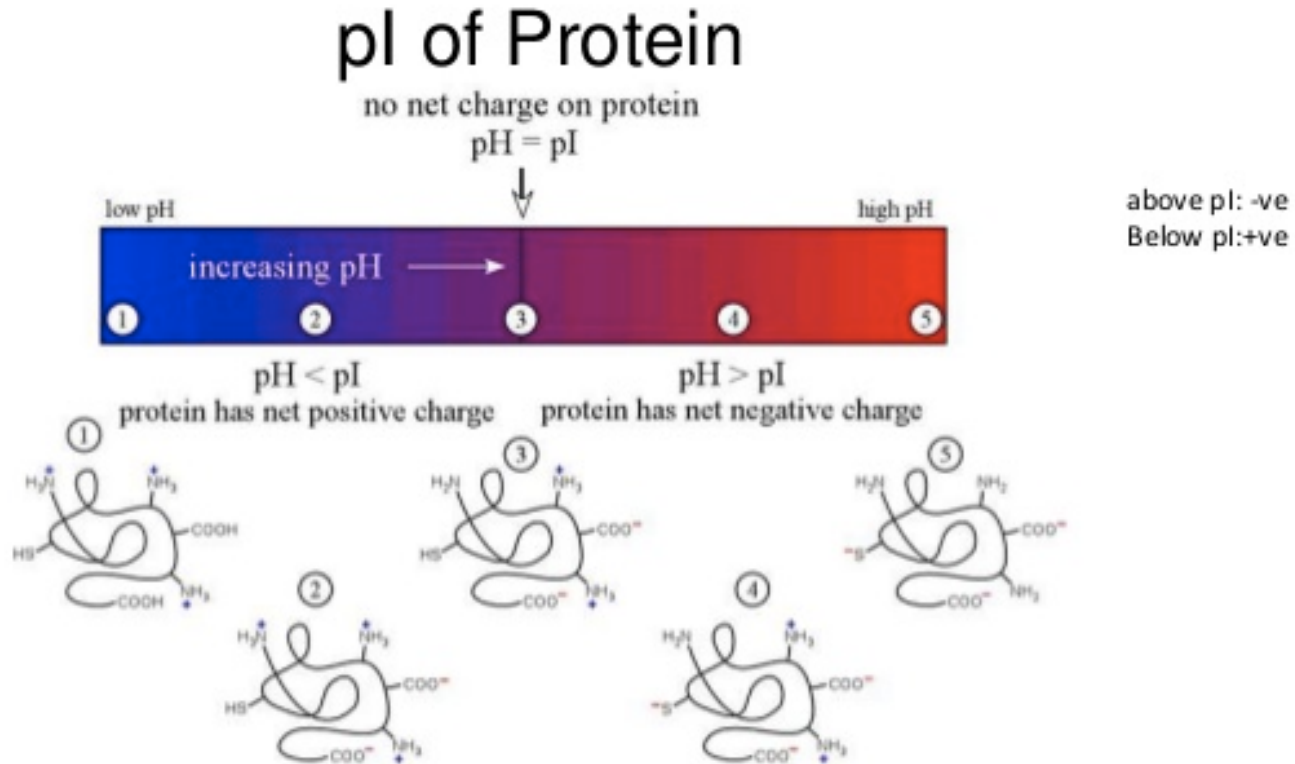
Table 5-2

**Isoelectric Points of
Several Common Proteins**

Protein	pI
Pepsin	<1.0
Ovalbumin (hen)	4.6
Serum albumin (human)	4.9
Tropomyosin	5.1
Insulin (bovine)	5.4
Fibrinogen (human)	5.8
γ -Globulin (human)	6.6
Collagen	6.6
Myoglobin (horse)	7.0
Hemoglobin (human)	7.1
Ribonuclease A (bovine)	9.4
Cytochrome c (horse)	10.6
Histone (bovine)	10.8
Lysozyme (hen)	11.0
Salmine (salmon)	12.1

- Punto isoelettrico polipeptidi e proteine sono state proposte diverse teorie, si seguono delle tabelle stilate sperimentalmente.

Punto isoelettrico polipeptidi e proteine



- $pH < pI$ carica positiva netta
- $pH > pI$ carica negativa netta

Tecniche elettroforetiche

Tabella 6.2 Gruppi ionizzabili presenti nelle proteine

Gruppo aminoacidico	Ionizzazione dipendente dal pH	pK _a approssimativo
α-aminico N-terminale	$-NH_3 \rightleftharpoons NH_2 + H^+$	8.0
α-carbossilico C-terminale	$-COOH \rightleftharpoons COO^- + H^+$	3.0
β-carbossilico (Asp)	$-CH_2COOH \rightleftharpoons CH_2COO^- + H^+$	3.9
γ-carbossilico (Glu)	$-(CH_2)_2COOH \rightleftharpoons (CH_2)_2COO^- + H^+$	4.1
imidazolico (His)	$-CH_2 \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \quad \\ HN^+ \quad NH \\ \quad \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \rightleftharpoons -CH_2 \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \quad \\ N \quad NH \\ \quad \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} + H^+$	6.0
sulfidrilico (Cys)	$-CH_2SH \rightleftharpoons -CH_2S^- + H^+$	8.4
fenolico (Tyr)	$\text{C}_6\text{H}_4\text{OH} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_4\text{O}^- + H^+$	10.1
ε-aminico (Lys)	$-(CH_2)_4NH_3^+ \rightleftharpoons -(CH_2)_4NH_2 + H^+$	10.3
guanidinico (Arg)	$-NH-C(=NH_2^+)-NH_2 \rightleftharpoons -NH-C(=NH_2)-NH_2 + H^+$	12.5

Tecniche elettroforetiche

- L'elettroforesi è, dunque, il processo per cui molecole cariche si separano in un campo elettrico a causa delle loro diverse mobilità
- I *fattori* che influenzano la mobilità di una molecola in un campo elettrico comprendono :
 - la carica della molecola (q) (Coulomb)
 - il gradiente di potenziale del campo elettrico (E), dato dalla ddp tra i due elettrodi diviso la distanza in cm tra gli stessi ($V \cdot cm^{-1}$)
 - la resistenza di attrito del mezzo di supporto (f)
- Il prodotto dei parametri E e q ($E \times q$) fornisce la forza, misurata in Newton, che spinge una molecola di carica q verso un elettrodo di carica opposta

Tecniche elettroforetiche

- La forza frizionale (**f**), che rallenta il movimento della molecola carica, dipende dalle dimensioni della molecola, dalla sua forma, dalle dimensioni dei pori del mezzo nel quale avviene l'elettroforesi e dalla viscosità del tampone
- La velocità (**v**) di una molecola carica che si sposta in un campo elettrico è data, dunque, dalla seguente equazione:
$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$
- a parità di tutte le altre condizioni, cioè E ed f, la velocità di migrazione di una particella in un campo elettrico dipenderà dalla sua carica elettrica q.

Tecniche elettroforetiche

- Comunemente, non si fa riferimento alla velocità di migrazione di una particella nel campo elettrico, ma alla sua mobilità elettroforetica, indicata con μ e pari a:

$$\mu = \frac{v}{E}$$

$$(\mu = \frac{\text{cm}}{\text{sec}} / \frac{\text{V}}{\text{cm}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{sec} \cdot \text{V}} = \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{V}^{-1})$$

$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

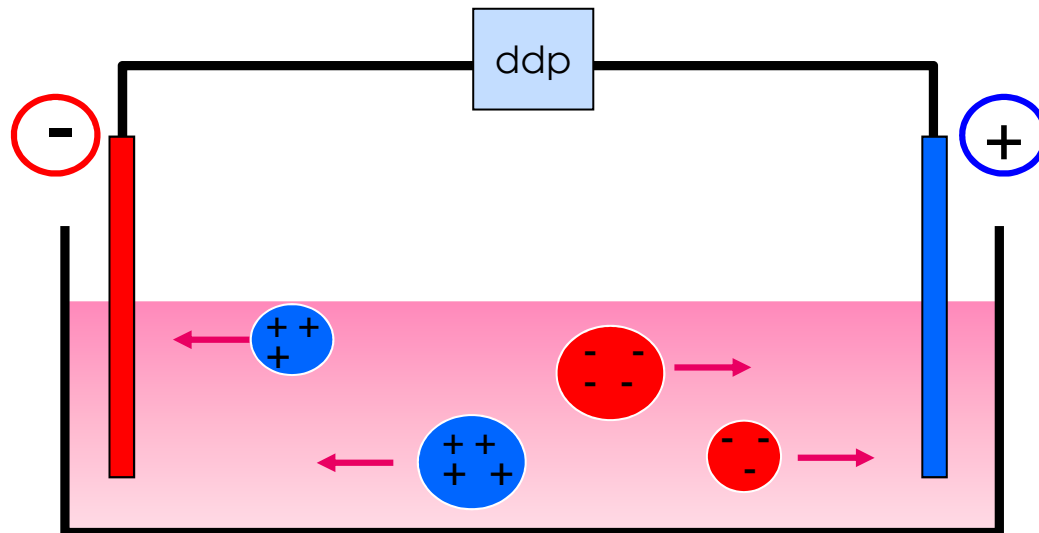
definita come la velocità, in cm/sec, in un campo elettrico unitario:

$$\mu = \frac{q}{f}$$

- Quindi, la mobilità è indipendente dal campo elettrico, ma dipende (a parità di altre condizioni) dalla struttura intrinseca della molecola (carica, dimensioni, forma, PM)

Tecniche elettroforetiche

- Quindi, la migrazione è DIRETTAMENTE proporzionale alla carica netta di una molecola, (che dipende dal proprio punto isoelettrico e dal pH del mezzo), ed INVERSAMENTE proporzionale alle dimensioni



Elettroforesi zonale

- Le particelle migrano e si separano, fra i pori di un supporto solido inerte, in base alla diversa mobilità e si raggruppano in zone ristrette;
- Supporti utilizzati:
 - su carta (non più in uso)
 - su acetato di cellulosa
 - su gel di agarosio
 - su gel di poliacrilammide
- Monodimensionale o bidimensionale;

Non setaccianti

Setacci molecolari

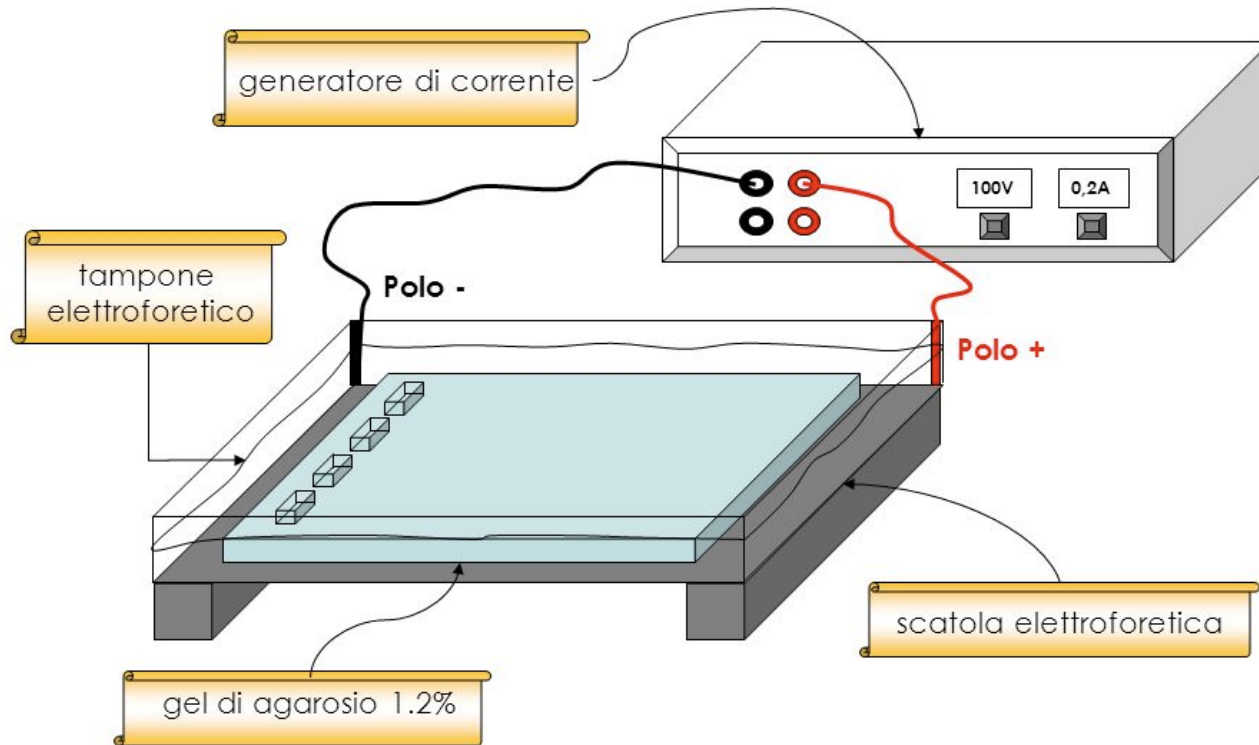
Elettroforesi: apparecchiatura

- Un alimentatore con potenza fino a 3000 V;
- Una cella o vaschetta per elettroforesi:
 - a sviluppo orizzontale (gel agarosio)
 - a sviluppo verticale (gel poliacrilammide)
- Una soluzione tampone opportuna;
- Una soluzione per la colorazione delle zone;
- Un indicatore di corsa (ad es. blu di bromofenolo);

Eventualmente:

- Un apparato per la preparazione del gel
- Un apparato per la lettura e la quantificazione

Elettroforesi: apparecchiatura

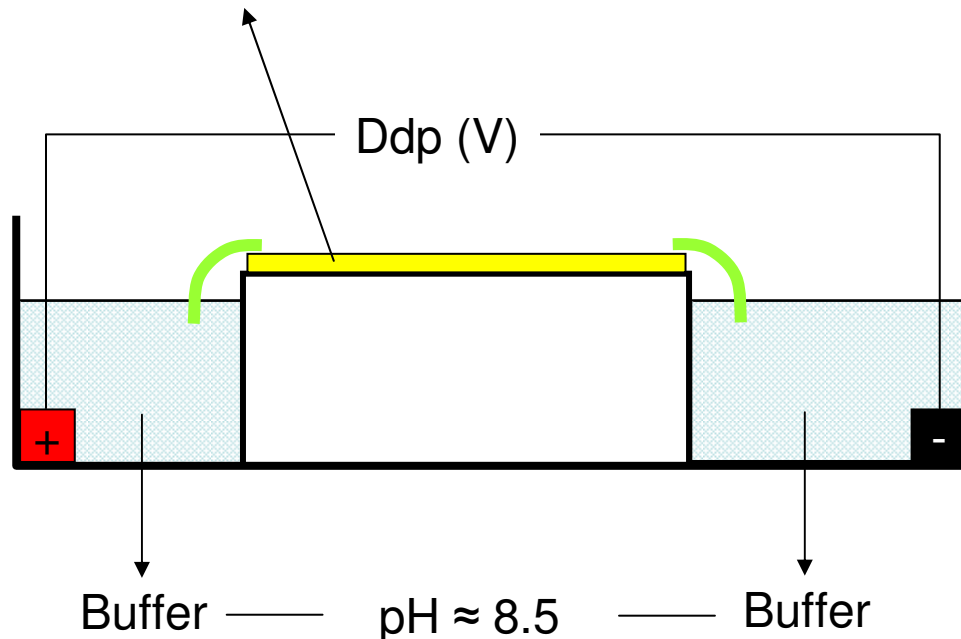


Elettroforesi su acetato di cellulosa

L'elettroforesi su acetato di cellulosa, che pur essendo una metodica che non raggiunge le risoluzioni ottenibili con i più moderni gel di poliacrilamide ed agarosio, riveste ancora un ruolo in ambito clinico per la valutazione delle proteine del siero ed altre specifiche applicazioni.

- Metodiche relativamente veloci=>Buona applicabilità in campo diagnostico/clinico

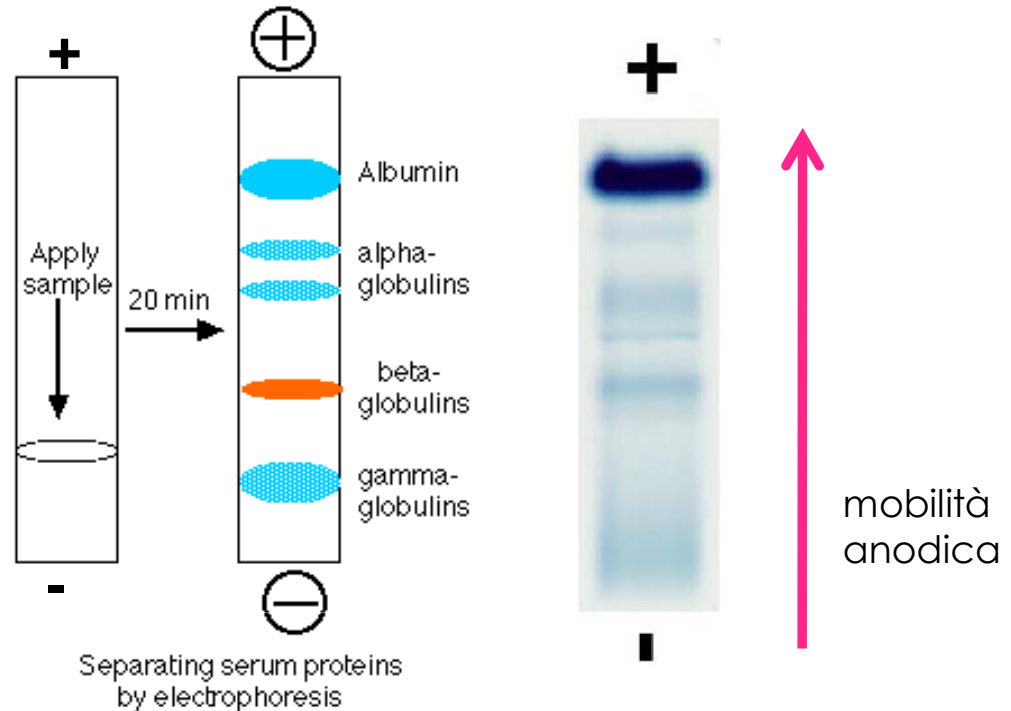
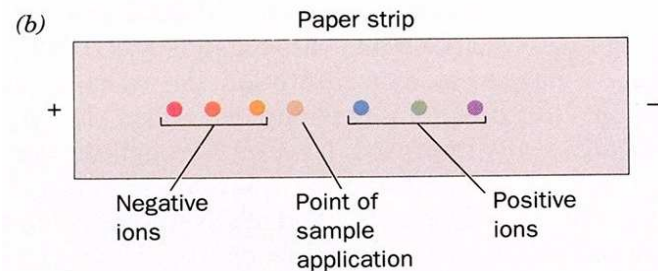
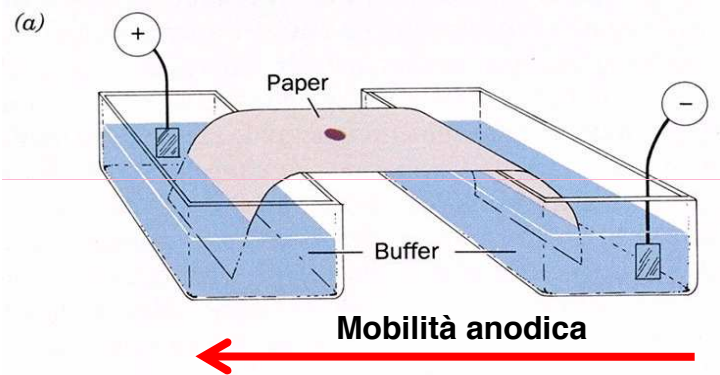
Striscia di acetato di cellulosa



Durata analisi 15 minuti

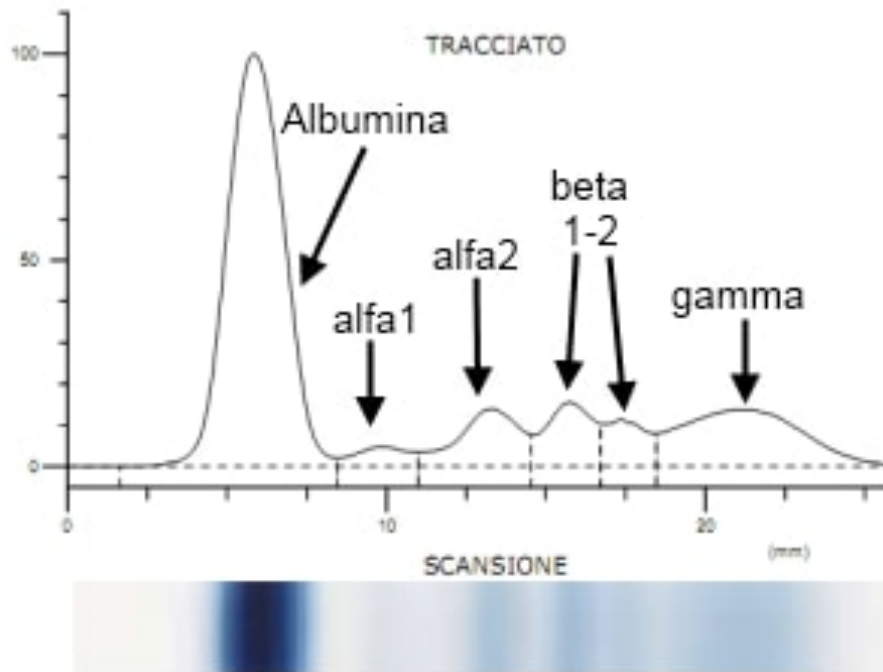
Elettroforesi su acetato di cellulosa

- La separazione avviene solo in base alla carica
- Proteine con una carica negativa migrano verso il catodo. L'albumina è quella con maggiore carica negativa e migra più lontano dall'anodo
- Si immerge la striscia in una soluzione colorante per visualizzare le bande

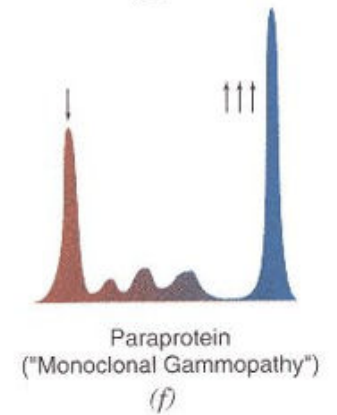
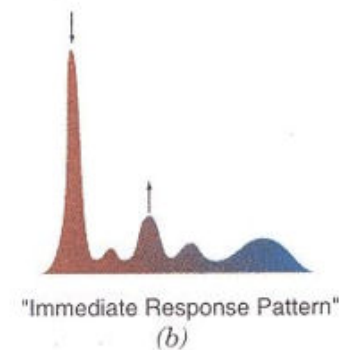
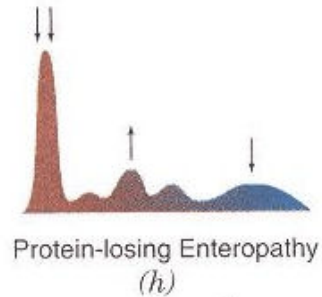
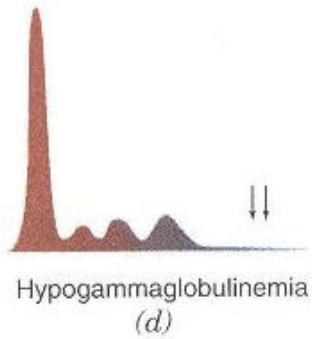
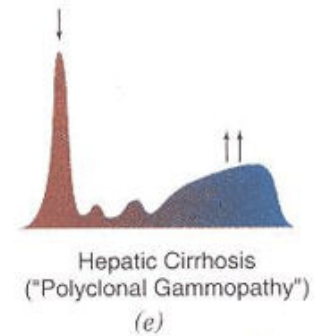
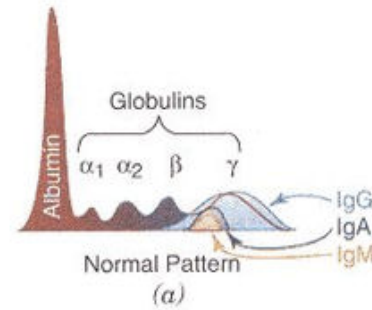
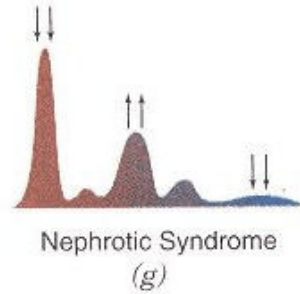
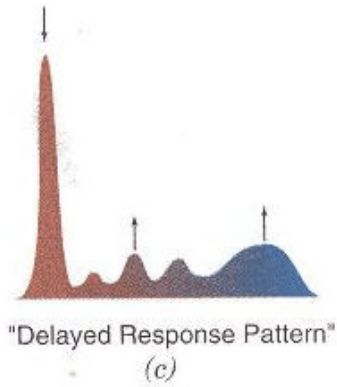


Elettroforesi su acetato di cellulosa

Protidogramma: ottenuto dal densitometro, che è uno spettrofotometro in grado di leggere su latrine di acetato di cellulosa



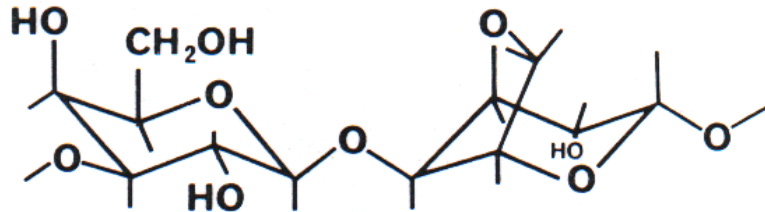
Elettroforesi su acetato di cellulosa



Elettroforesi su gel di agarosio

Agarosio

- Polisaccaride dell'agar, materiale isolato da alghe; è un polimero lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici

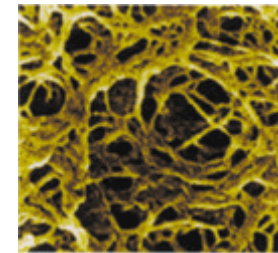
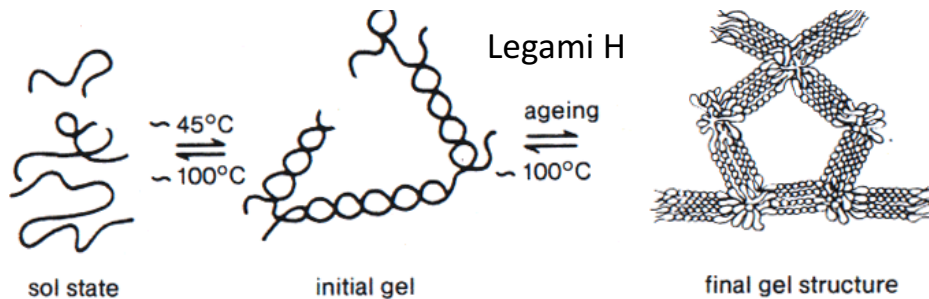


- Si presenta come una polvere biancastra insolubile in acqua fredda

Elettroforesi su gel di agarosio

Agarosio

- Si prepara scaldando all'ebollizione una sospensione acquosa di agarosio, sino a chiarificazione; si lascia, quindi, raffreddare. Intorno ai 45°C si ha la formazione del gel, i cui pori sono di dimensione inversamente proporzionale alla concentrazione dell'agarosio



Agarosio solidificato
Setaccio molecolare

- Agarosio modificato mediante aggiunta di gruppi CH_3 sui gruppi OH ha temperature di transizione minori (low melting agarose)

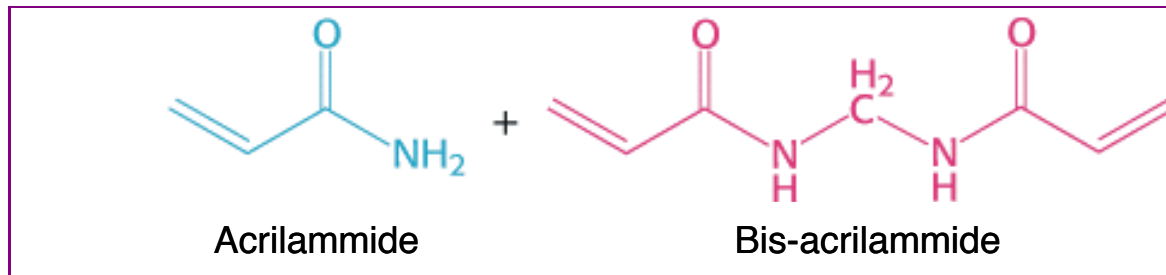
Elettroforesi su gel di agarosio

- Usato sia per la separazione proteica che per l'elettroforesi di **acidi nucleici DNA e RNA (maggiormente usato)**
- Per l'analisi di proteine sieriche, si usa generalmente una soluzione 0,8% di agarosio in tampone a pH 8.7

Concentrazione agarosio	Range separazione proteine (kDa)	Range Acidi nucleici (bp)
1 %	1000 - 150000	> 3000
2%	80 - 40000	1340
4%	50 - 15000	860
6%	10 - 5000	180

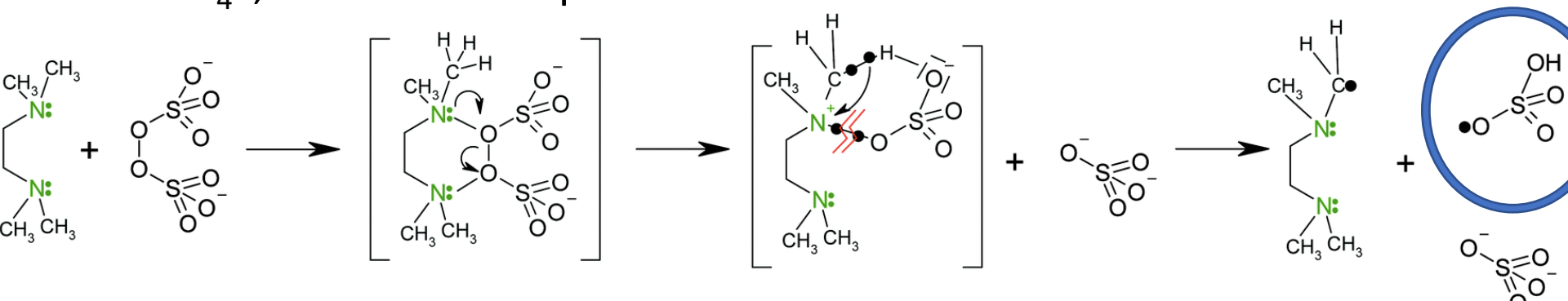
Elettroforesi su gel di poliacrilammide

- La PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*, è una delle metodiche elettroforetiche più utilizzate;
- I gel di poliacrilammide sono preparati facendo copolimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N,N'-metilene bisacrilammide (bis-acrilamide)

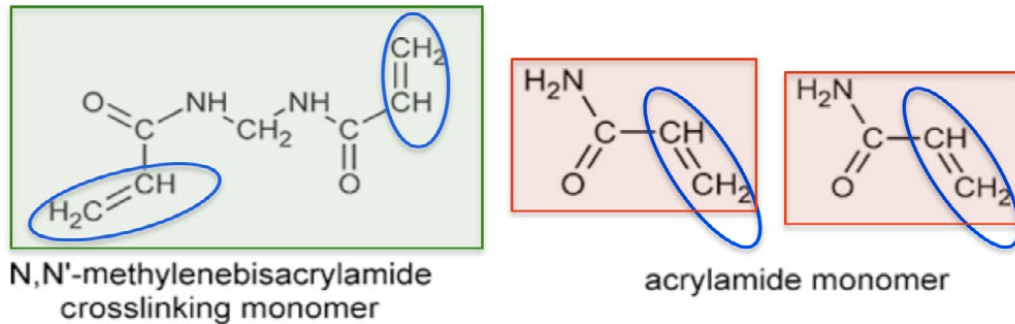


Elettroforesi su gel di poliacrilammide

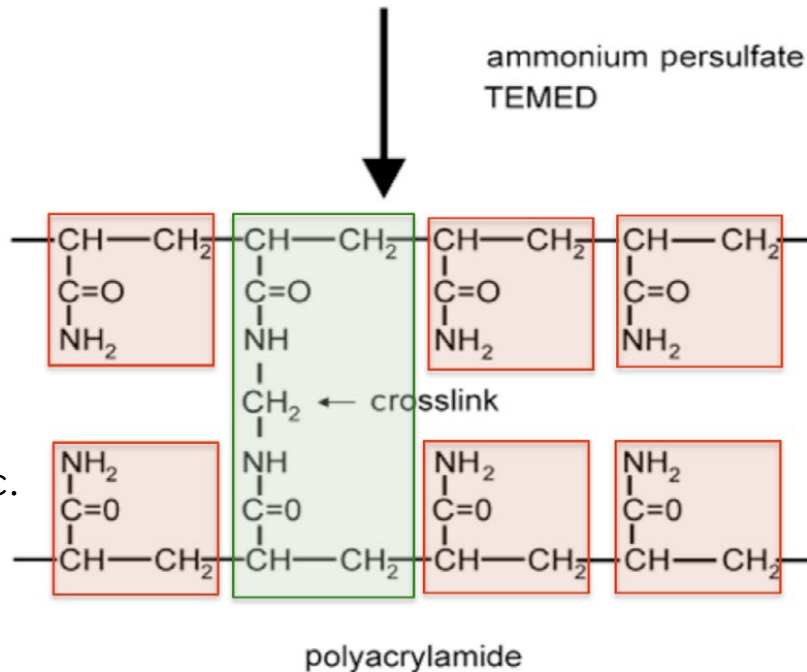
- La bis-acrilammide, composta da due molecole di acrilammide legate da un gruppo metilene, è utilizzata come agente in grado di formare legami crociati (cross-linking agent)
- I monomeri di acrilammide polimerizzano nel senso testa-coda e occasionalmente si legano ad una molecola di bis-acrilammide.
- Il processo di polimerizzazione dell'acrilammide avviene per catalisi radicalica ed inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (**inziatore**) e della base N,N,N',N'-tetrametilendiammina (**TEMED, catalizzatore**). Il TEMED decompone lo ione persolfato dando origine al radicale libero $\cdot\text{SO}_4^-$, che innesca la polimerizzazione:



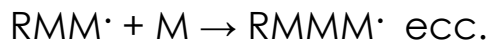
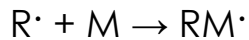
Elettroforesi su gel di poliacrilammide



ammonium persulfate
TEMED



R= radicale solfato
M monomero acrilammide



Siccome l'ossigeno rimuove i radicali liberi, tutte le soluzioni di acrilammide vengono degassate prima dell'uso per pochi minuti

Elettroforesi su gel di poliacrilammide

- La poliacrilammide è il polimero più utilizzato per la elettroforesi di proteine con PM tra 5.000 e 200.000 Da
- I suoi vantaggi sono:
 - notevole resistenza meccanica sia quando i gel sono idratati che quando vengono seccati;
 - completa trasparenza sia nel visibile che nell'UV, che resta anche quando i gel sono seccati;
 - aderisce bene al vetro evitando che si creino vie preferenziali;
 - La sua porosità può essere controllata: si può modulare l'effetto di setaccio molecolare
 - E' utilizzabile per la elettroforesi sia nativa che denaturante;
- Svantaggi:
 - il monomero è una potente neurotossina per via dermica!!!
 - Preparazione più lunga rispetto all'agarosio

Elettroforesi su gel di poliacrilammide

- Si può modulare la dimensione media dei pori, variando la percentuale di acrilammide (in genere la percentuale di bisacrilammide è lasciata costante), come in altri SETACCI MOLECOLARI: 3 - 30% di acrilamide → porosità 2 - 0,5 nm

Proteine relativamente piccole → migrazione più veloce

Proteine relativamente grandi → migrazione più lenta

% ACRILAMMIDE bassa → SEPARAZIONE MOLECOLE ALTO PM

% ACRILAMMIDE alta → SEPARAZIONE MOLECOLE BASSO PM

Elettroforesi su gel di poliacrilammide di proteine

Condizioni Native

- Le proteine mantengono la loro struttura secondaria/terziaria ed eventualmente quaternaria
- Le proteine vengono separate sulla base della loro carica netta e in base alle dimensioni
- La sua risoluzione è relativamente bassa
- Discrimina tra proteine con PM uguale, ma con carica differente
- Permette lo studio di proteine polimeriche
- Permette la rapida purificazione e il recupero di proteine in condizioni native
- Le proteine vengono separate in base alla carica nativa al pH del gel (di solito 8,7) e in base alle proprietà di setaccio molecolare del gel, si usano basse concentrazioni di poliacrilammide (7,6%)

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

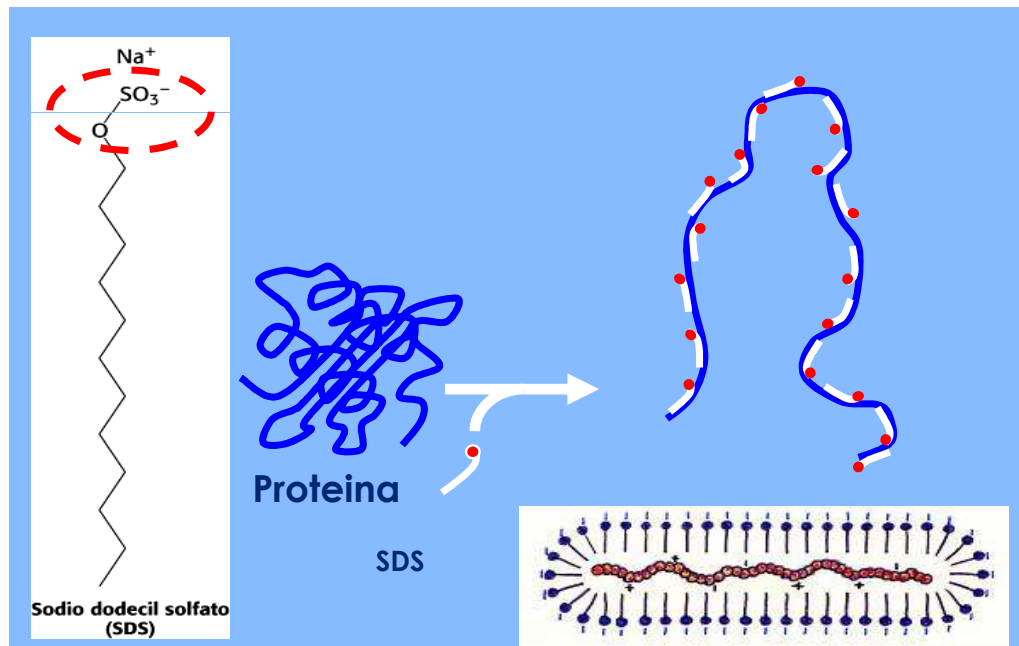
Condizioni Denaturanti (SDS)

- La struttura secondaria/terziaria ed eventualmente quaternaria delle proteine viene persa a causa dell'utilizzo di detergenti, SDS
- è uno dei metodi più largamente usati per separare le proteine e determinare il loro peso molecolare

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

L'interazione SDS/proteine

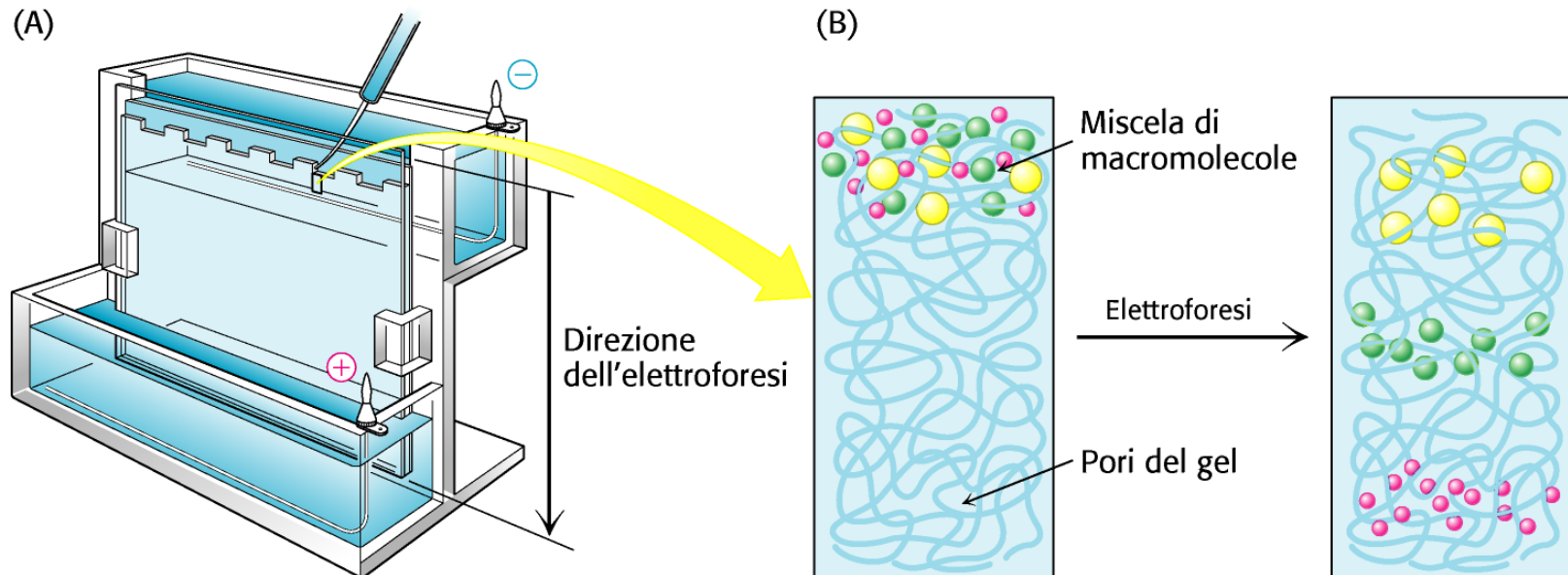
- provoca la destabilizzazione della struttura terziaria della proteina denaturandola
- conferisce una carica netta negativa rendendo trascurabile la carica della proteina nativa
- il risultato è che la proteina assume una forma linearizzata ed una carica negativa approssimativamente proporzionale alla sua massa, in modo che il rapporto carica/massa sarà essenzialmente identico per proteine diverse



In eccesso di SDS, un grammo di proteina si lega a circa 1,4 g di SDS, fornendo alla proteina una carica negativa costante per unità di massa.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- La separazione dei complessi SDS-proteine (quando sottoposti ad un campo elettrico) avviene quindi in base agli effetti di setaccio molecolare dovuti alle dimensioni dei pori del gel.
- Ciò fa sì che le proteine più piccole si muovano rapidamente attraverso il gel, mentre quelle di dimensioni maggiori sono più rallentate, migrando di meno.



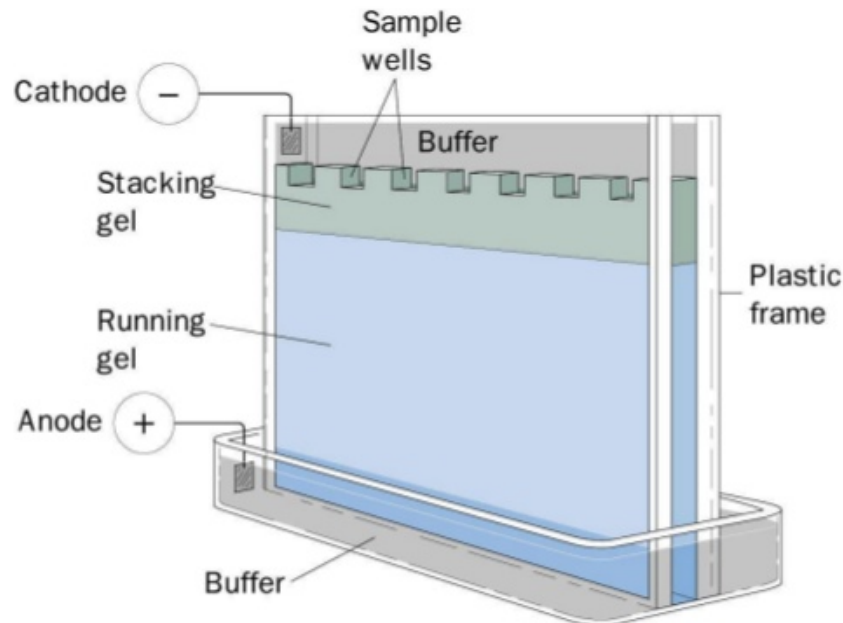
Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

Principali impieghi della SDS-PAGE

- Proteomica (analisi dell'insieme delle proteine di una cellula)
- Controllo di omogeneità (purificazione di proteine)
- Caratterizzazione (determinazione del peso molecolare)
- Analisi con anticorpi (western blotting)

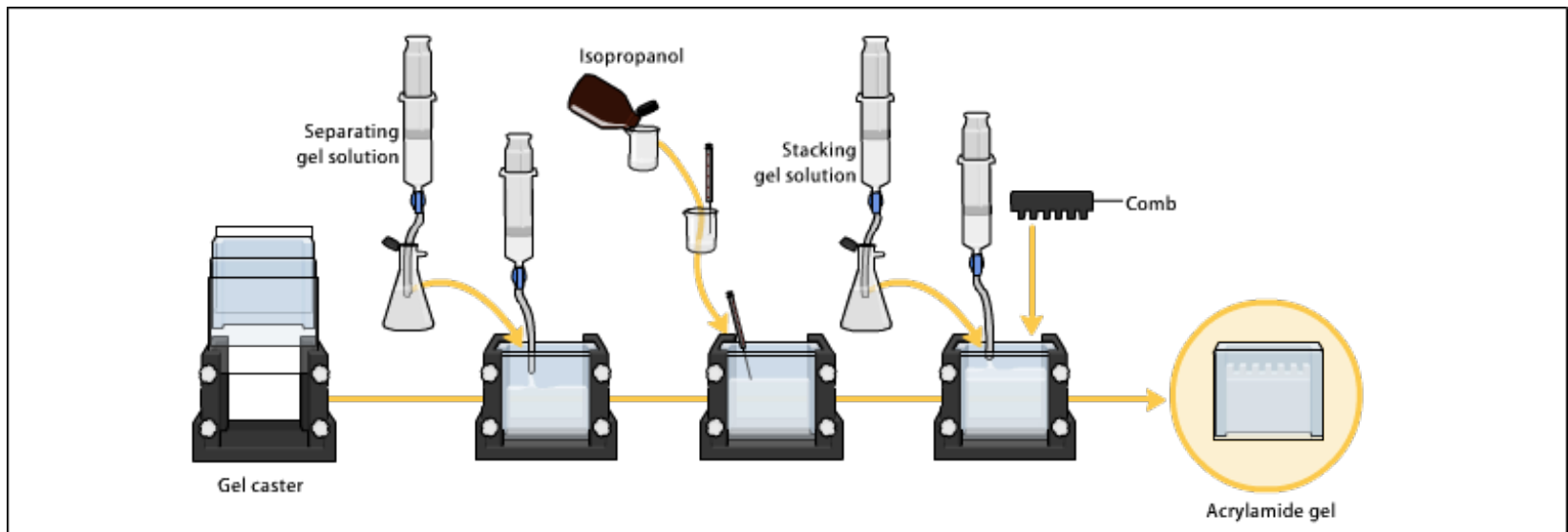
Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- Nella SDS-PAGE si utilizza un gel discontinuo composto da:
 - Stacking gel nel quale vengono formati i pozzetti in cui vengono depositati i campioni da analizzare: percentuale bassa di gel (3-5%) possiedono pori di grosse dimensioni per impaccare e concentrare le proteine in una linea prima di separarsi
 - Running gel (gel di risoluzione) che è la matrice in grado di separare le singole macromolecole: ha una percentuale compresa fra il 7,5 e il 20% , pori più piccoli con l'aumentare della concentrazione



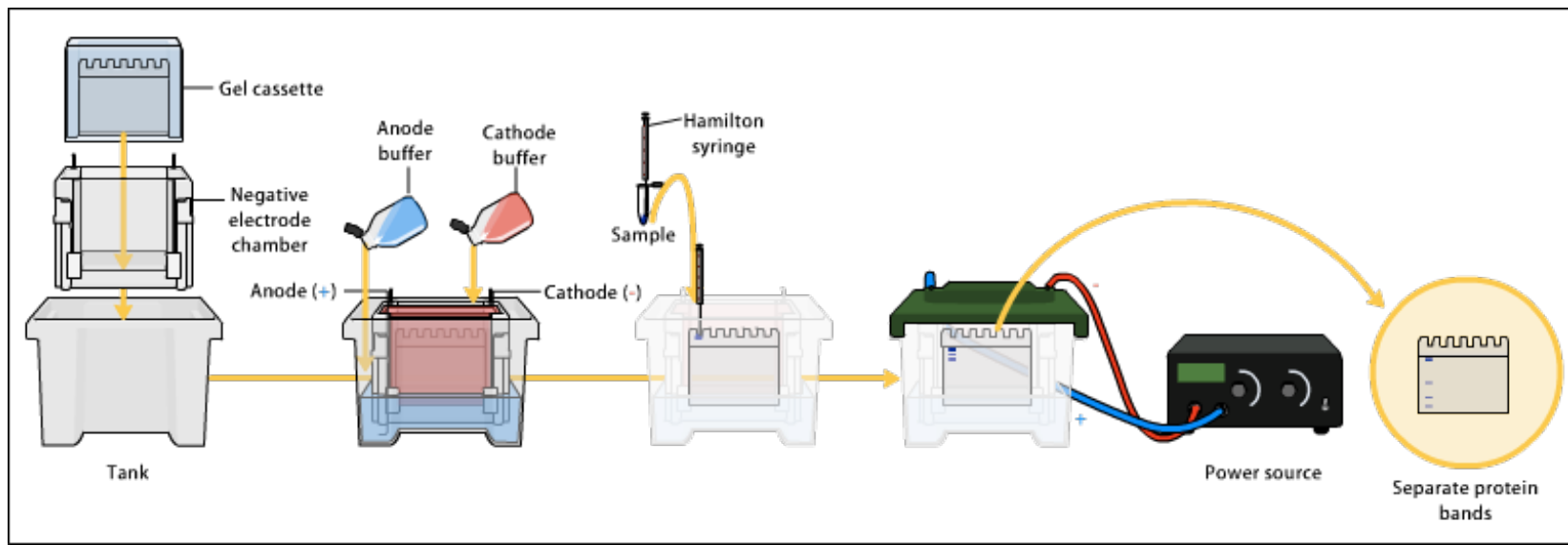
Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- Il running gel viene fatto polimerizzare fra due lastre di vetro che sono mantenute parallele e separate da sottili spaziatori di plastica. Normalmente il gel ha uno spessore di 0,8-1,5 mm e le sue dimensioni dipendono dalla risoluzione che si vuole ottenere
- Sulla superficie del running gel viene depositata una piccola quantità di una soluzione acqua/butanolo per ottenere una superficie piatta
- Dopo la rimozione dell'acqua/butanolo, al di sopra del running gel viene colato quello che sarà lo stacking gel
- Prima che il gel polimerizzi si sistema sul lato superiore del gel un "pettine" di plastica che a gelificazione ultimata viene tolto lasciando nel gel i pozzetti di alloggio per il caricamento dei campioni



Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- Quando il gel è pronto, viene assemblato nell'apparato per l'elettroforesi, rappresentato essenzialmente dalla cella elettroforetica costituita da due vasche a contatto con le due estremità del gel
- Tali vasche, contenenti ciascuna un elettrodo, vengono riempite di una soluzione tampone opportuna (Tampone di corsa)

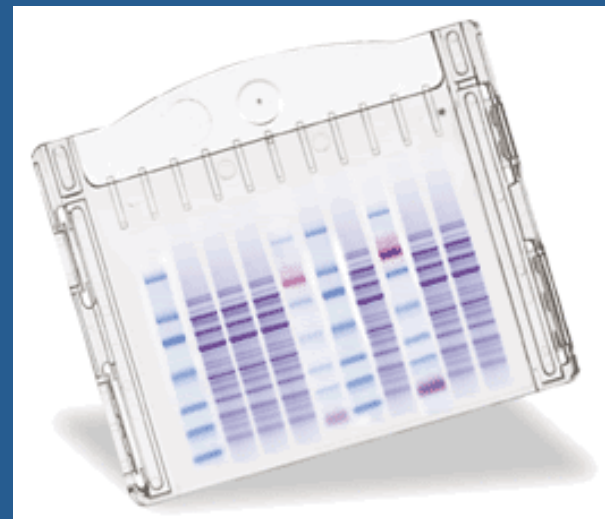
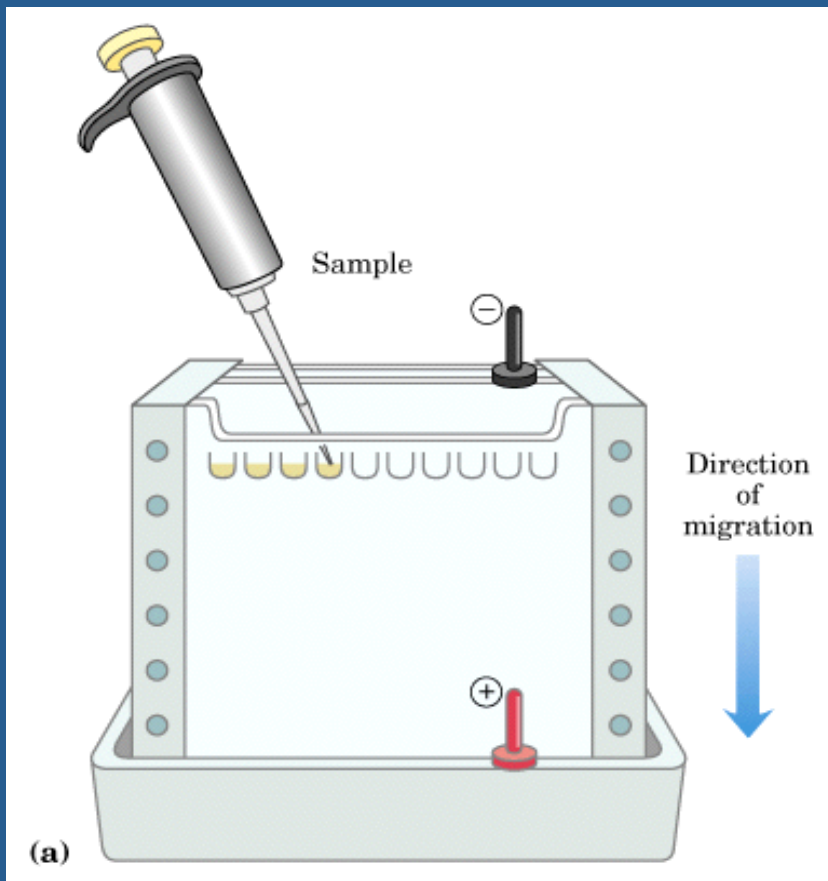


Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

Preparazione dei campioni

- i campioni proteici sono di solito solubilizzati in un tampone Tris/HCl a pH 6,8 contenente *SDS*, un riducente *quale ditiotreitolo o β -mercaptoetanololo*, per ridurre i ponti disolfuro, saccarosio o glicerolo per aumentare la densità e *blu di bromofenolo* come indicatore della corsa
- Deposito dei campioni nei pozzetti: vengono depositati piccoli volumi dei campioni (nell'ordine dei μ l)
- Una volta caricati i campioni, tra i due elettrodi viene applicata una differenza di potenziale
- Togliendo il campo elettrico prima che le molecole da analizzare abbiano raggiunto il fondo del gel avremo ottenuto una separazione dei singoli componenti in base alla loro mobilità elettroforetica
- A questo punto essi vengono visualizzati mediante opportuni metodi di colorazione o di rivelazione

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

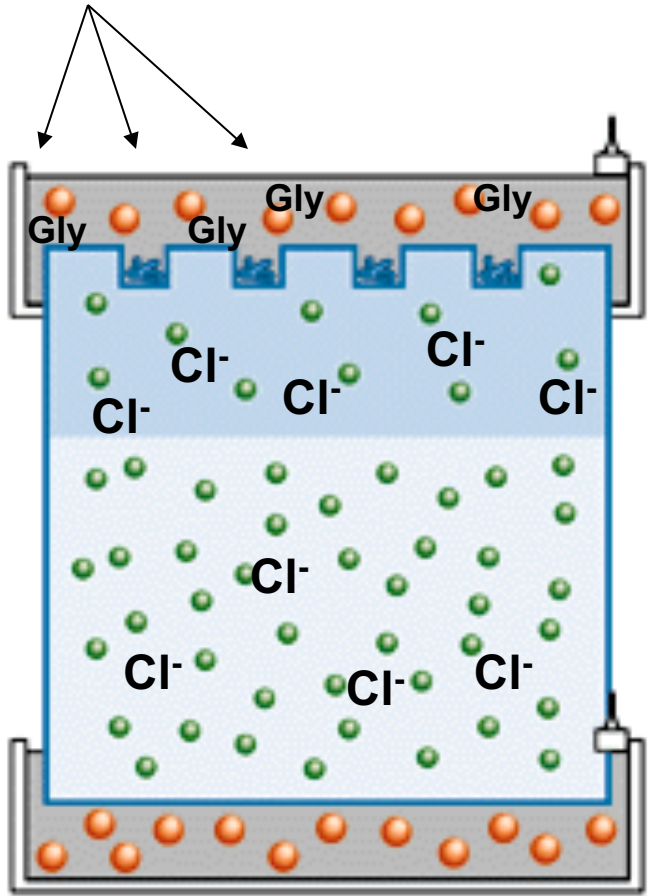


Colorazione con Blu di Coomassie

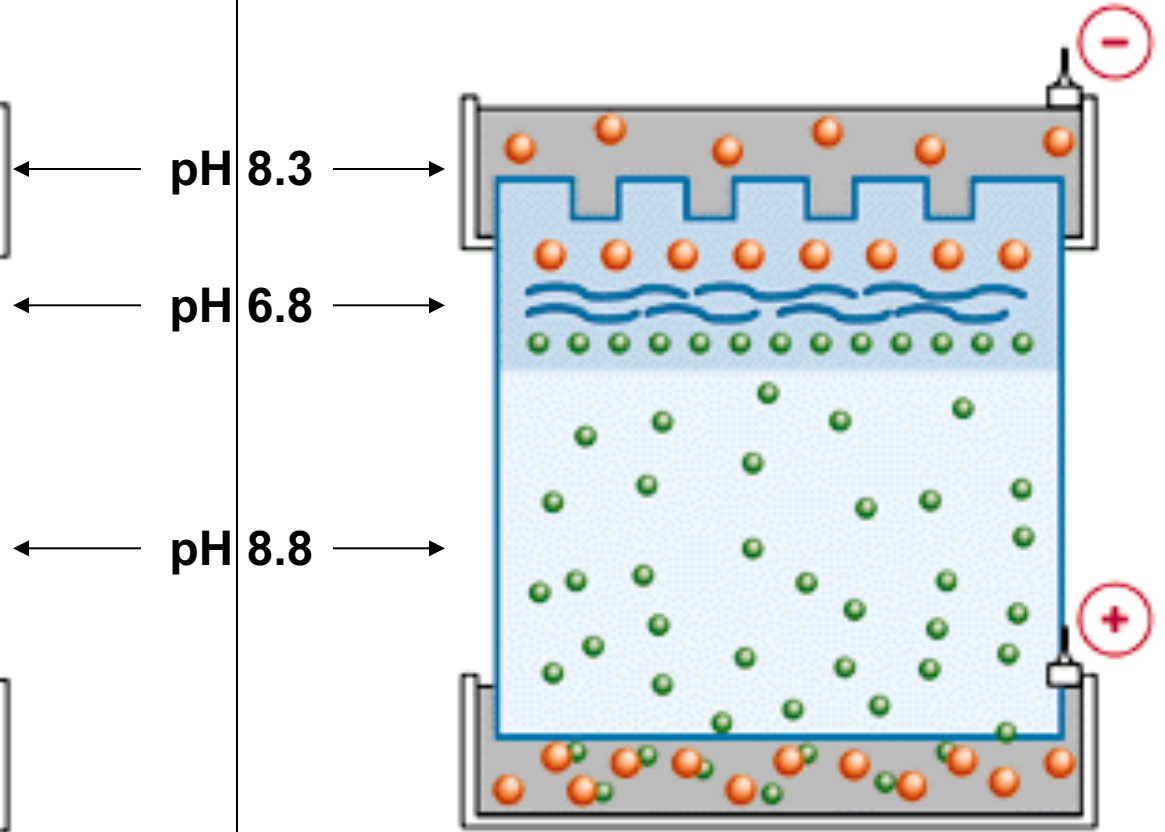
Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- lo stacking gel: poliacrilammide al 4% (3-5%) in tampone Tris/HCl 0,125 M pH 6,8 contenente SDS
- il running gel: poliacrilammide al 7,5-20% in tampone Tris/HCl 0,375 M pH 8,8 contenente SDS
- Tampone di corsa: Tris/glicina pH 8,3 + SDS
- Il pH dello stacking gel è inferiore di circa 2 unità rispetto a quello del tampone di corsa.
- In quest'ultimo il pH è 8,3 e la glicina (acido debole) è quindi presente per il 5% sotto forma di ione dipolare (zwitterione $\text{CH}_2(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$) e per il 95% sotto forma di anione glicinato ($\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COO}^-$)

Nel buffer di corsa a pH 8.3 la glicina è carica negativamente e comincia a migrare con una certa velocità



Arrivata allo stacking gel e al buffer (entrambi a pH 6.8) la glicina è quasi neutra ed è la specie più lenta, mentre gli ioni Cl^- sono la specie più veloce

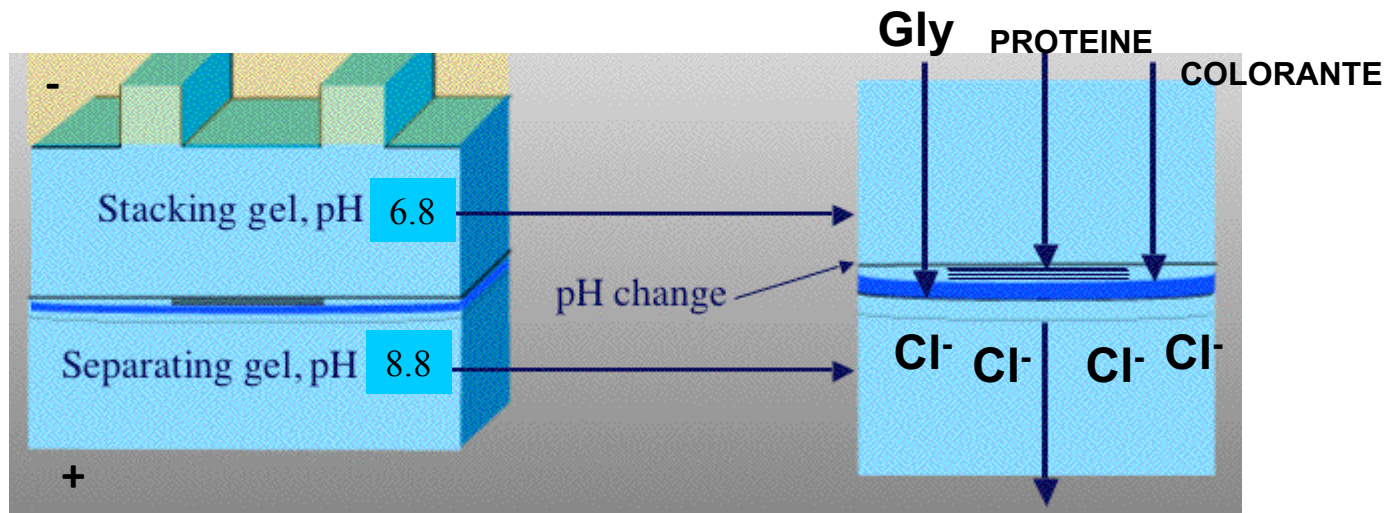


In questo modo la glicina non potrà portare efficacemente la corrente e saranno le stesse proteine a portarla, migrando verso l'anodo

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

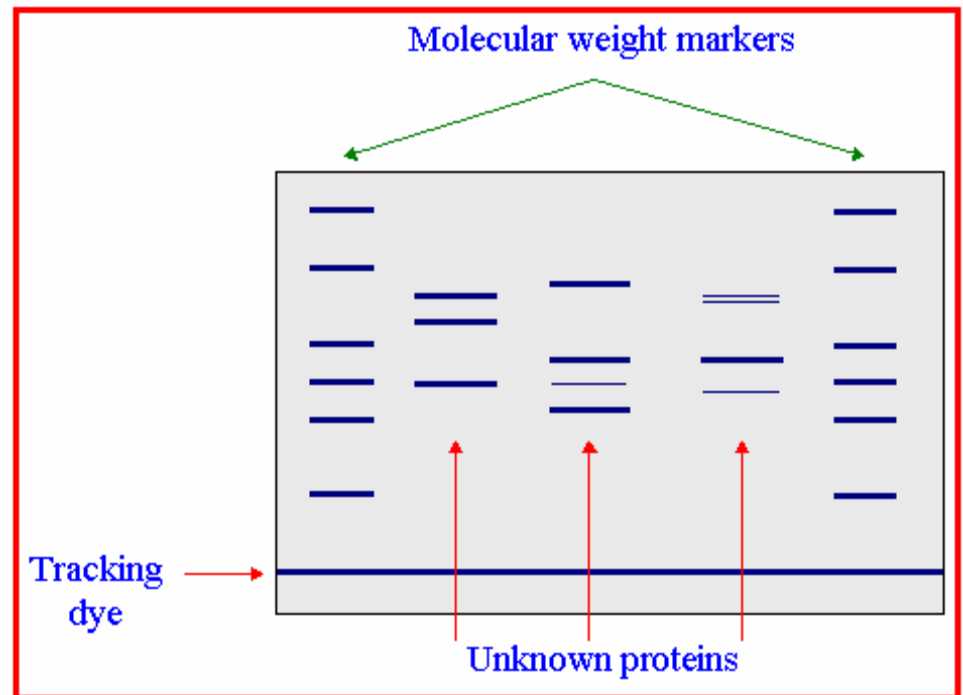
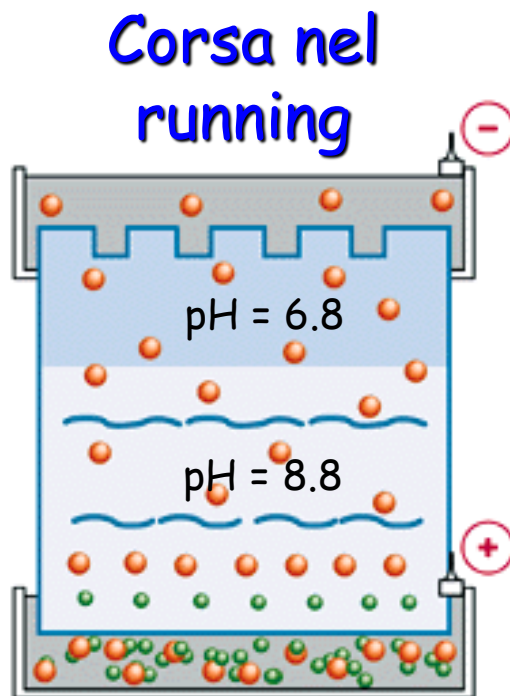
All'inizio del separating gel il pH 8.8 riporta la glicina ad un rapporto carica/massa maggiore rispetto a quello delle proteine. La glicina supera i polipeptidi, che non trovandosi più in una regione ad elevata mobilità elettroforetica rallentano notevolmente e si ritrovano compattati in una linea molto sottile. Ora le proteine si trovano tutte allo stesso livello.

Nel separating la concentrazione di acrilamide è più alta, e comincia la separazione del campione in base al peso molecolare.



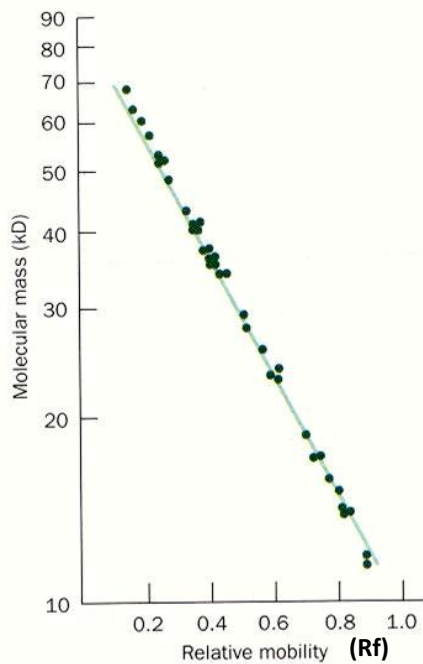
Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- Quando il fronte del colorante blu (presente nel campione) raggiunge la prossimità del fondo del gel, è il momento di interrompere la corsa
- Per monitorare la progressione della corsa elettroforetica uno o più pozzetti vengono generalmente dedicati ai markers di peso molecolare
- Questi sono miscele di proteine precolorate e di peso molecolare noto capaci quindi di indicare la migrazione di proteine di peso molecolare simile

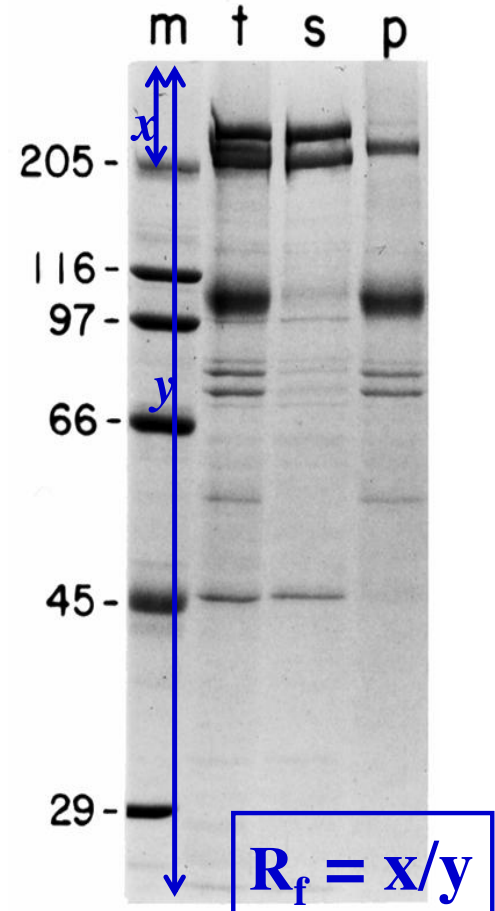


Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- La massa molecolare relativa (M_r) di una proteina può essere determinata confrontando la sua mobilità con quella di una serie di proteine “standard” R_f , delle quali si conosce la massa molecolare relativa, separate sullo stesso gel



In grafico la distanza percorsa da ciascuna delle proteine standard, in funzione del logaritmo in base 10 del suo M_r , costruendo una curva di calibrazione. Si misura quindi la distanza di migrazione della proteina avente M_r incognita e per interpolazione si ottiene il valore di M_r cercato



Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

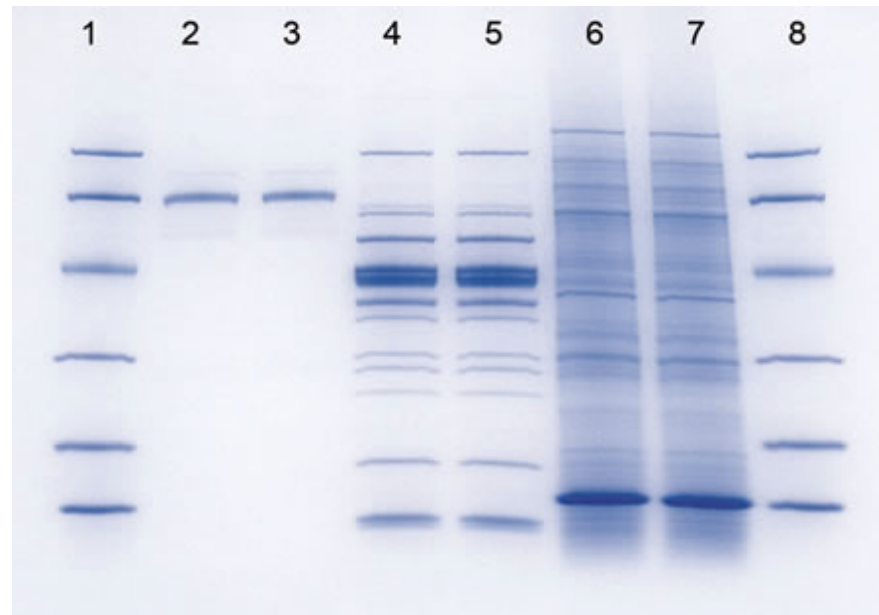
Rilevazione delle proteine su gel

- Una volta completata l'elettroforesi, il gel deve essere analizzato per avere informazioni sulla posizione e sulla quantità di ogni proteina
- Poichè le proteine non sono direttamente visibili, il gel deve essere processato (il blue di bromofenolo è per seguire il fronte della corsa ed è molecola molto piccola)
- La procedura più comune di rivelazione è la colorazione

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

Rilevazione delle proteine su gel

- **Blu Coomassie**: il blu Coomassie si lega alle proteine attraverso legami ionici tra i gruppi sulfonici del colorante e i gruppi amminici delle proteine oltre che attraverso forze di Vander-Waals
 - Si aggiunge il colorante in acido acetico e metanolo, si lascia a reagire finchè tutto il gel è diventato blu (la mix di metanolo serve a fissare le proteine nel gel) 2h
 - poi si decolora con acido acetico e metanolo (over night) .
 - La colorazione visualizza bande con una concentrazione di circa 0.1µg di proteina, ma l'intensità è direttamente proporzionale alla quantità

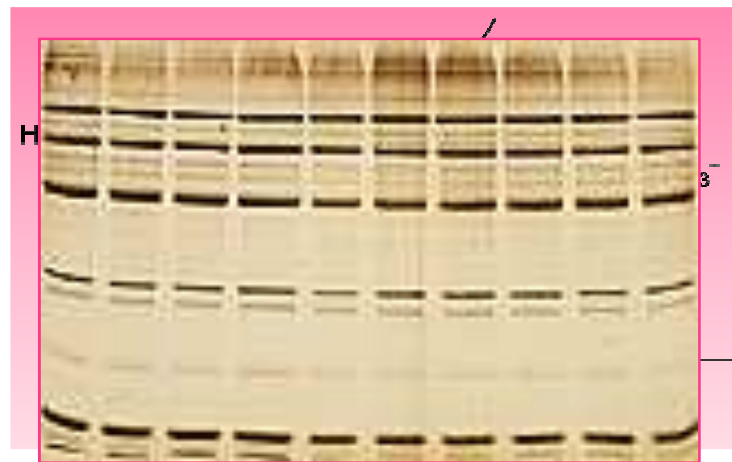


Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

Rilevazione delle proteine su gel

Argento

- Si fissano le proteine con il metanolo, si aggiunge nitrato di argento che si lega alle proteine
- Si aggiunge quindi formaldeide in bicarbonato per ridurre l'Ag⁺ ad argento metallico. La reazione viene fermata con acido acetico
- Ha la sensibilità di 1 ng, ma l'intensità non è direttamente proporzionale alla quantità



Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS (SDS-PAGE)

- Vantaggi:
 - I complessi proteina-SDS sono altamente carichi e tutti negativi (vanno tutti al catodo)
 - Si separano in base alla dimensione consentendo la determinazione del PM
 - SDS solubilizza quasi tutte le proteine Le bande si fissano e si colorano facilmente
- Svantaggi:
 - Glicoproteine possono migrare in modo anomalo
 - Proteine basiche o di membrana migrano in modo anomalo e/o si solubilizzano male

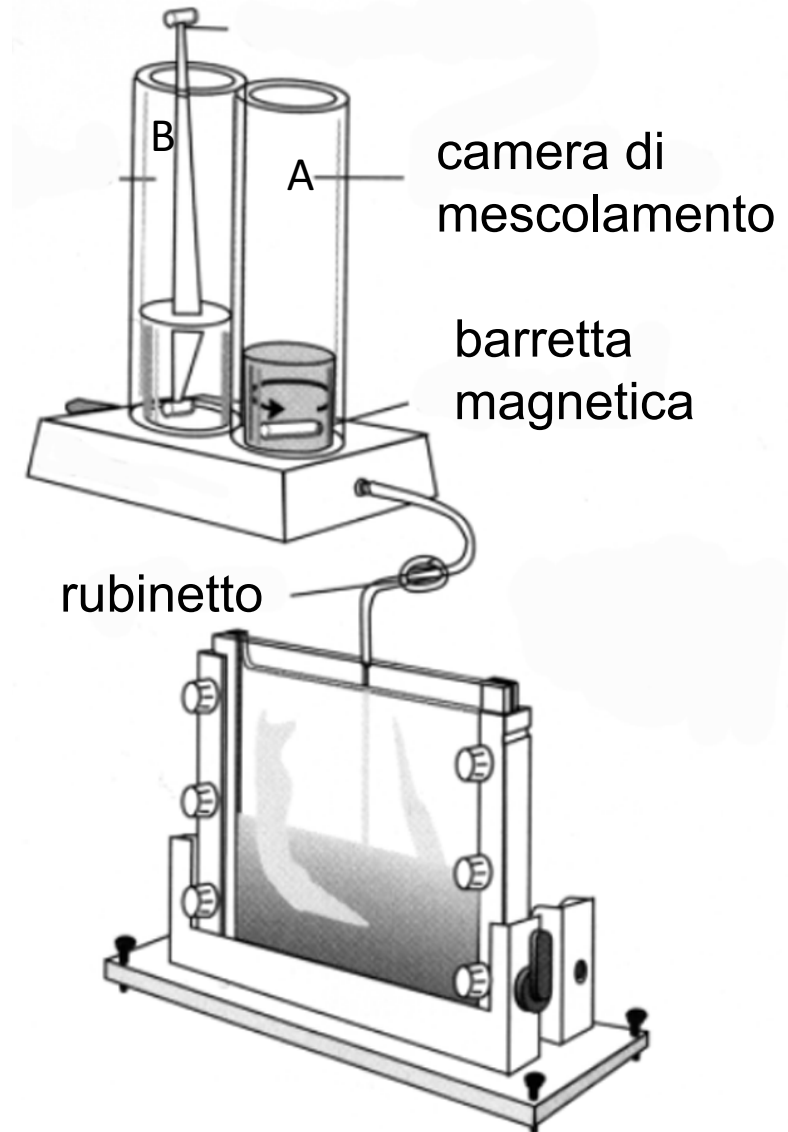
Elettroforesi su gel di poliacrilammide in gradiente

- Si possono utilizzare gel di poliacrilammide in gradiente di concentrazione. I gradienti vengono fatti con un gradientatore e le concentrazioni dei gel vanno dal 5% al 25% con un decremento delle dimensioni dei pori, che comporta una migliore risoluzione delle proteine a basso peso molecolare.
- La migrazione delle proteine verrà progressivamente frenata dalla progressiva riduzione dei pori fino ad essere totalmente interrotta nei punti in cui la dimensione dei pori diventa più piccola del diametro delle proteine e si formeranno così bande molto strette e altamente risolte
- È possibile separare proteine con un intervallo di Massa relativa molto più ampio rispetto ad un gel a porosità costante
- Le proteine con Mr molto simili possono essere separate

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in gradiente

Formatore di gradiente

- ✓ posto sopra i vetri per far colare il flusso per gravità
- ✓ Due recipienti A e B collegati alla base da un sottile connettore, da A un connettore arriva al contenitore del gel
- ✓ In A c'è la soluzione con la concentrazione massima di Acrilammide in B quella minima
- ✓ Quando il liquido esce da A, è sostituito da B a causa dell'equilibratura della pressione idrodinamica che tiene i livelli di A e B uguali. A è sempre in agitazione, il che provoca la diluizione di A con B fino a che , quando il formatore di gradiente è vuoto esce solo B



ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

FOCALIZZARE (CONCENTRARE) NEL MEDESIMO PUNTO PROTEINE CON MEDESIMO pI

- La separazione proteica non avviene in un tampone a pH definito, bensì in un mezzo nel quale è presente un gradiente di pH, crescente dall'anodo (ambiente acido) al catodo (ambiente basico)
- La separazione delle proteine avviene, quindi, non sulla base del differente PM, ma sulla base del differente punto isoelettrico
- E' basata sull'uso di polielettroliti anfoteri, (es. poliammine policarbossiliche) denominati ampholine, posti in commercio con varie denominazioni (Ampholyte, Bio-Lyte, Pharmalyte), che copolimerizzano in un gel di acrilammide, garantendo il gradiente di pH
- Un gradiente di pH immobilizzato si forma legando covalentemente gruppi tamponanti acidi o basici ad una matrice (acrilammide)
- Ha elevata risoluzione ed è usata per separare composti anfoteri, aa, peptidi e proteine

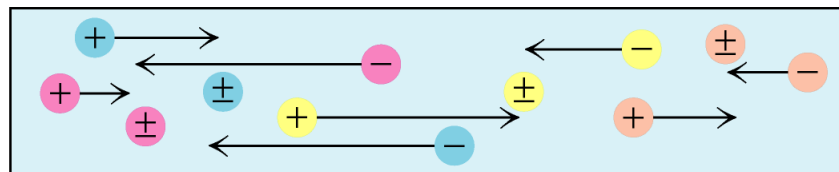
ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

FOCALIZZARE (CONCENTRARE) NEL MEDESIMO PUNTO PROTEINE CON MEDESIMO pI

- Le proteine sono molecole anfotere, che portano una carica netta positiva, negativa o pari a zero a seconda del valore di pH dell'ambiente in cui si trovano
- In un gradiente di pH e sotto l'azione di un campo elettrico, ogni proteina della miscela si muoverà fino ad incontrare un valore di $\text{pH} = \text{pI}$

(A)

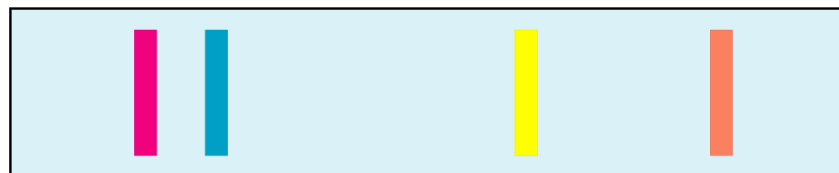
pH basso
(+)



pH alto
(-)

(B)

pH basso
(+)



pH alto
(-)

- ✓ Eccellente risoluzione ($\Delta\text{pI} < 0,01$ unità di pH), bande molto nette e sensibilità elevate;
- ✓ Largo intervallo di pI
- ✓ Alto voltaggio (generalmente > 1000 V)

ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

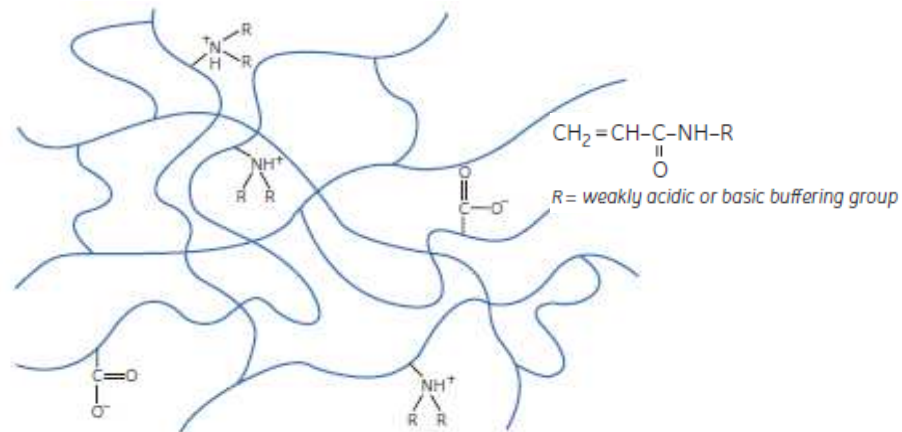
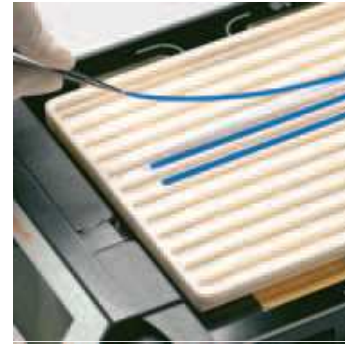
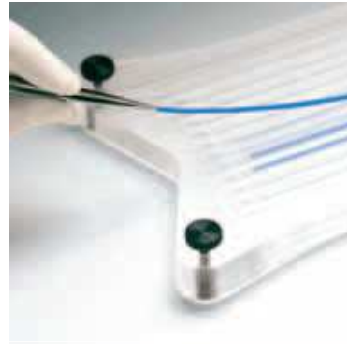
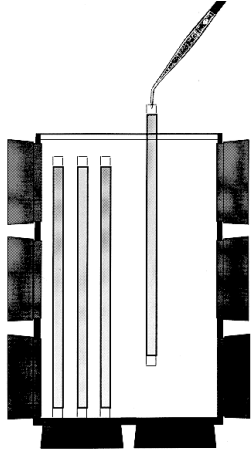
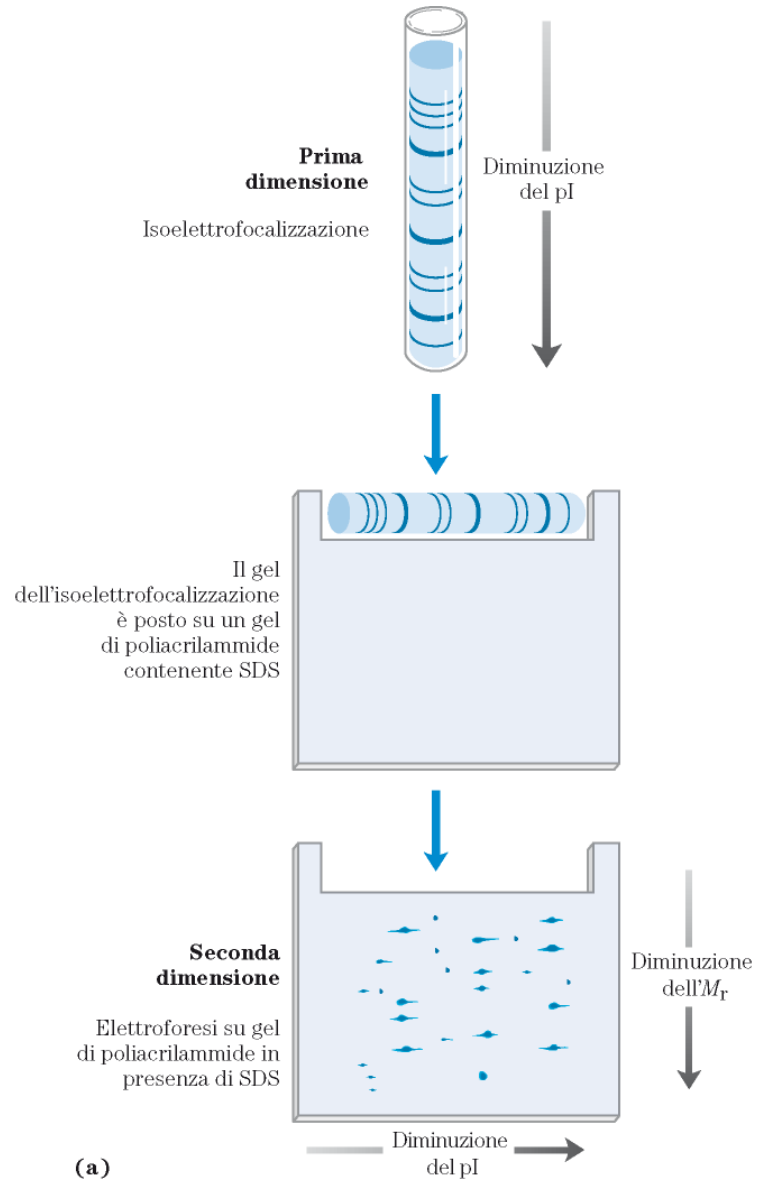


Fig 17. Immobilized pH gradient polyacrylamide gel matrix showing attached buffering groups.

2D PAGE

- Combina le caratteristiche della IEF, nella quale le proteine sono separate in base alla loro carica, con quella della SDS-PAGE classica, in cui le proteine sono separate in base alla loro massa.
- Tale combinazione consente di disporre di uno dei metodi analitici più sofisticati per la separazione di miscele proteiche complesse
 - 1°GEL: IEF su gel di poliacrilammide (IPG), con separazione proteica in base al diverso pl. Terminata la separazione la strip è incubata con SDS;
 - 2°GEL: il 1° GEL è posizionato adiacente ad un SDS-PAGE, fissato. Può iniziare l'elettroforesi nella seconda dimensione e le proteine legate all'SDS entrano nel 2° gel e si separano sulla base del diverso peso molecolare.

2D PAGE

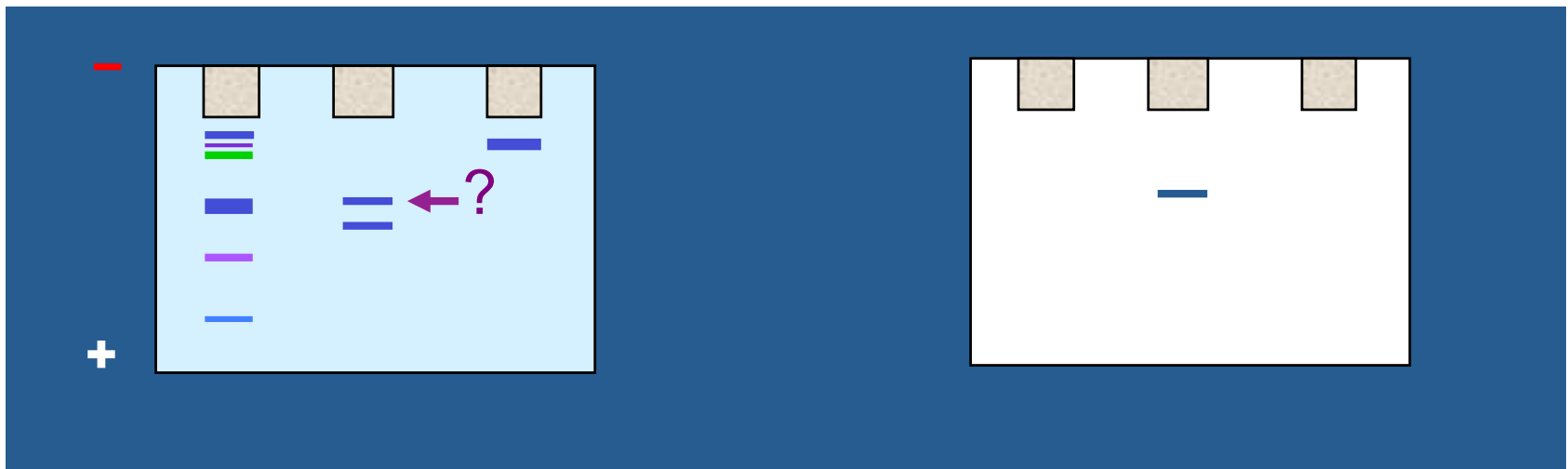


Western Blot

Una tecnica in cui le proteine sono separate mediante elettroforesi su gel e successivamente trasferite su un supporto (membrana o filtro). Successivamente una specifica proteina viene identificata mediante la sua reazione specifica con un anticorpo. Questa tecnica si usa quando il campione corso è composto da una miscela di moltissime proteine tali che con una colorazione standard non si riuscirebbe a distinguerle l'una dall'altra, oppure quando, pur avendo bande ben distinte (**discrete**), la proteina di interesse è in quantità troppo basse per essere visualizzata con altre tecniche

Qual è la proteina che mi interessa?

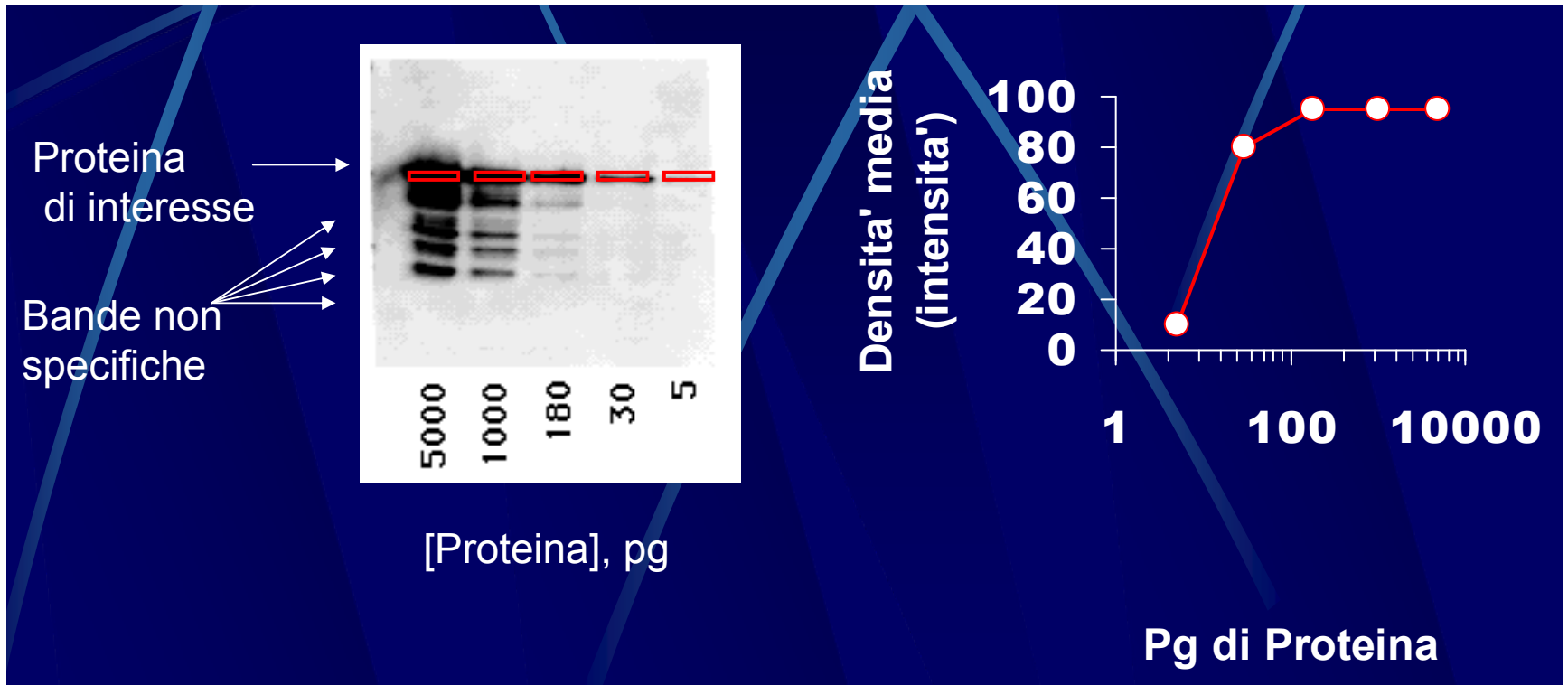
- SDS-PAGE (non certo)
 - Si basa sul confronto di peso molecolare
- Western blot (certo)
 - Si basa su una reazione specifica antigene-anticorpo



Western Blot

Quanta proteina c'è?

- Risultati dalla sds page con densitometro



Fasi del Western Blot

- **Prima fase: elettroforesi su gel.**
Le proteine del campione vengono separate su un gel in base alle loro dimensioni
- **Seconda fase: trasferimento su membrana.** Le proteine nel gel sono poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante un campo elettrico
- **Terza fase: saturazione o “blocking”.** La saturazione è usata per prevenire le interazioni non specifiche tra l'anticorpo e la membrana
- **Quarta fase: legame dell'anticorpo primario.**
L'anticorpo riconosce la proteina specifica immobilizzata sulla membrana

Fasi del Western Blot

- **Quinta fase: legame dell'anticorpo secondario.** L'anticorpo secondario, coniugato a un enzima (AP o HRP), riconosce specificamente l'anticorpo primario, già legato alla proteina sulla membrana
- **Sesta fase: rivelazione o "detection".** L'enzima coniugato all'anticorpo secondario scinde un substrato che, in corrispondenza della proteina specifica, sviluppa precipitato colorato o chemio luminescenza (luminol)

2^a Fase Western Blot

- **Elettroblotting**

- Apparato di trasferimento

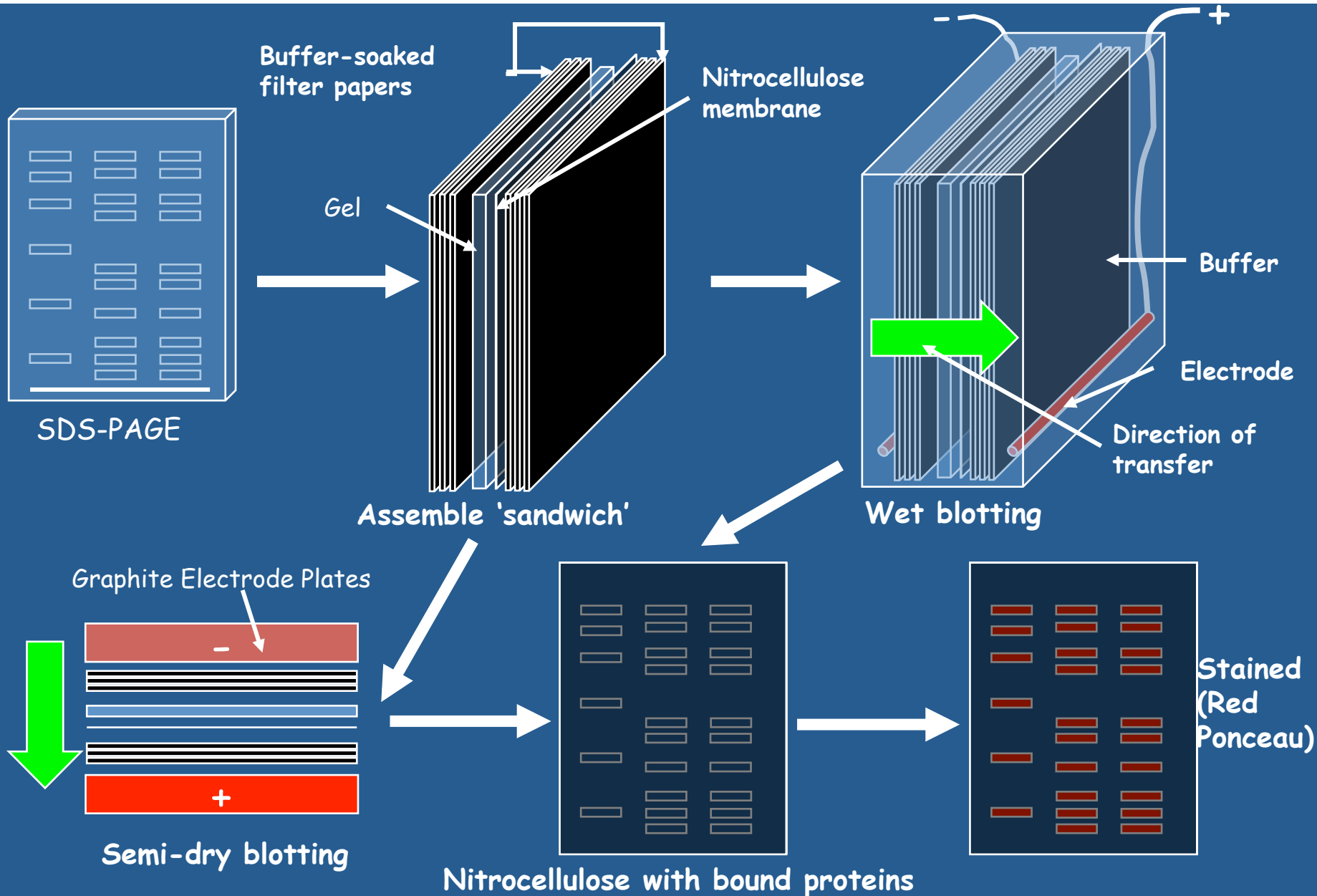
- Il gel è messo tra strati di carta da filtro con la membrana a diretto contatto col gel sul lato verso l'elettrodo positivo. Nitrocellulosa (NC): lega le proteine tramite interazioni elettrostatiche o idrofiliche; fragili

- PVDF: interazioni idrofobiche, usate per la loro resistenza chimica e per la stabilità fisiologica, ma è più difficile eluire le proteine nel caso ce ne sia bisogno

- Viene applicato un campo elettrico e le proteine migrano fuori dal gel verso l'elettrodo positivo e si legano alla membrana

- Fatto a 4°C per evitare surriscaldamento, decomposizione del tampone e degradazione delle proteine

2^a Fase Western Blot



Fasi Western Blot

3° saturazione

- Per saturare i siti idrofobici liberi sulla membrana
- Per prevenire il legame dell'anticorpo primario alla membrana stessa
- Latte scremato o Albumina di Siero Bovino (BSA)

4° incubazione con anticorpo primario

L'anticorpo primario riconosce la proteina di interesse e non lega le altre proteine immobilizzate sulla membrana

5° Fase

Incubazione con anticorpo secondario

6° fase

rivelazione o "detection": Il substrato metabolizzato dalla perossidasi può dare una colorazione o emettere luce che impressiona una lastra. Le lastre vengono sviluppate e fissate

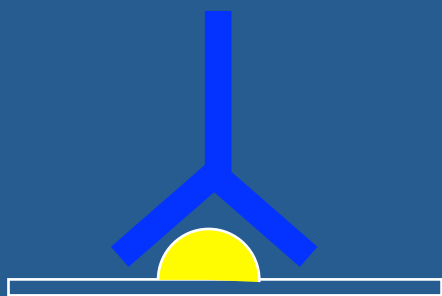
Fasi Western Blot

6° fase

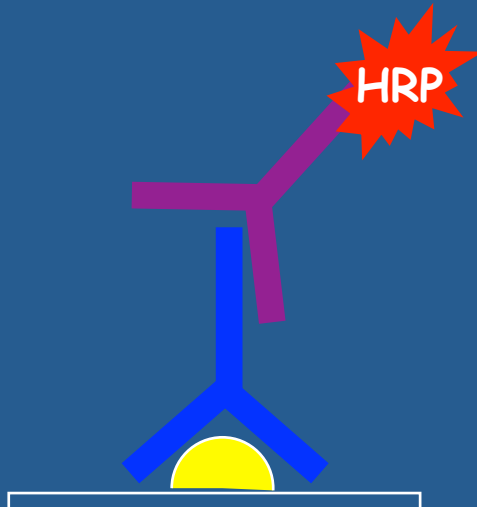
rivelazione o “detection”:

- ✓ Il substrato metabolizzato dalla perossidasi può dare una colorazione
- ✓ Luminescenza: come substrato, luminol. In presenza di perossidasi e H_2O_2 il luminol viene ossidato: si produce luce a 425 nm che impressiona una lastra. Le lastre vengono sviluppate e fissate.
- ✓ Mediante l'utilizzo di un software di elaborazione delle immagini si procede con la misura della densità di pixel della banda proteica rilevata sulla membrana. La densità di pixel è proporzionale alla quantità di quella determinata proteina presente nel campione analizzato. Di solito si usa imageJ

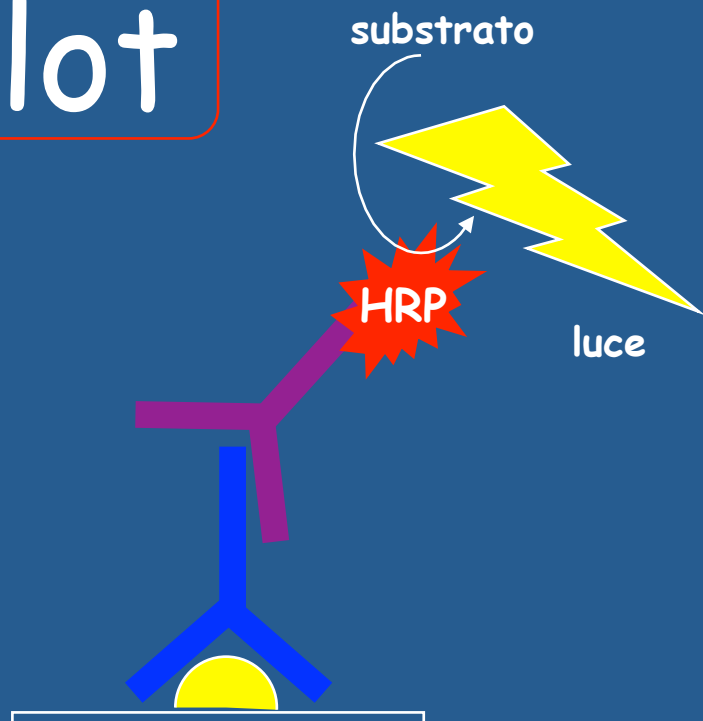
Western blot



Anticorpo primario

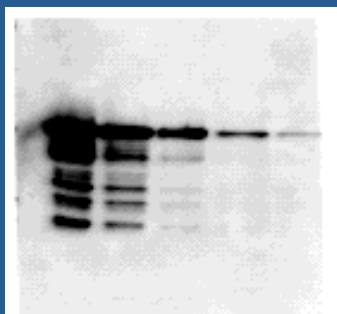


Anticorpo secondario



Rivelazione

Il substrato metabolizzato dalla perossidasi (HRP) emette luce

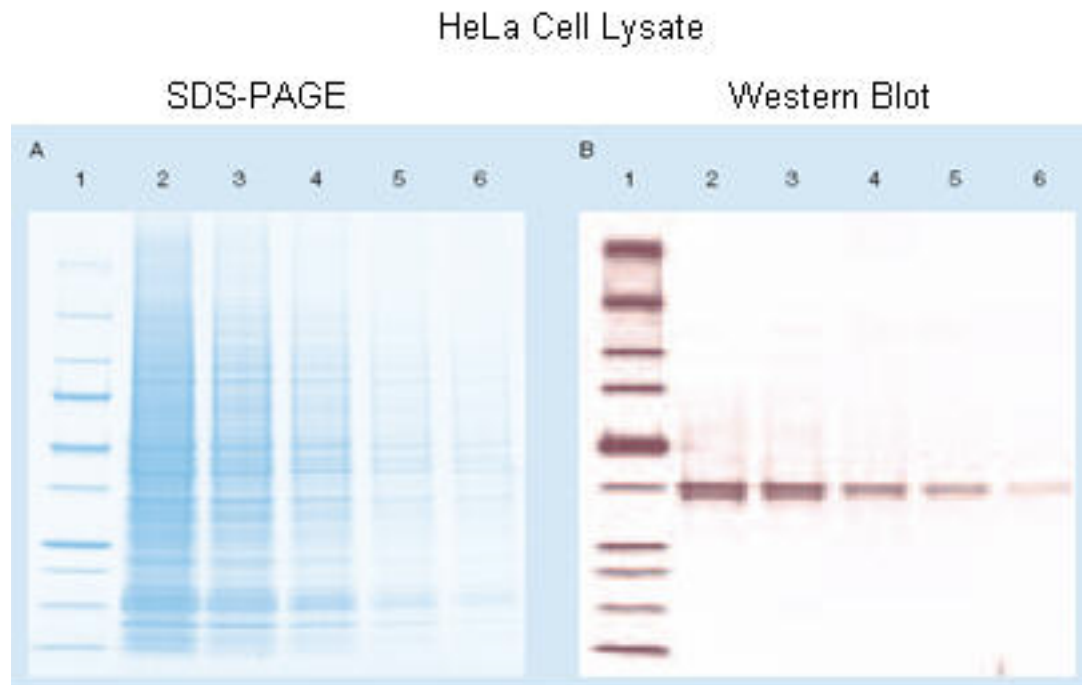


5000
1000
180
30
5

pg proteina

Western Blot

- Trasferimento su membrana immobilizzanti per rendere più accessibile la proteina (Ag) all'anticorpo (Ab).
- Membrane: Nitrocellulosa, PVDF, Nylon



Chemiluminescent Detection of CDK7
BioRad Bulletin 2032

Acidi nucleici

DNA

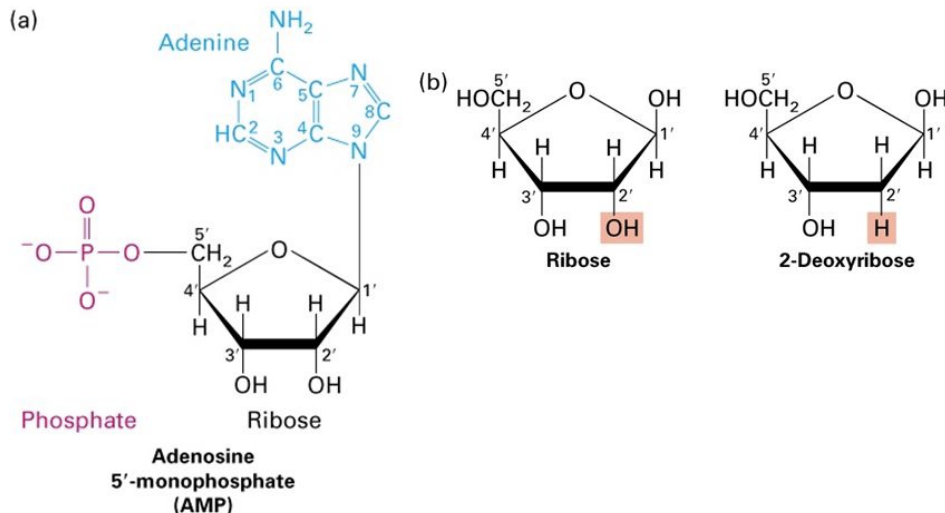
Vengono utilizzati per immagazzinare (DNA) e trasmettere (RNA) informazioni genetiche

DNA

✓ polimero composto da nucleotidi

Ogni nucleotide è formato da:

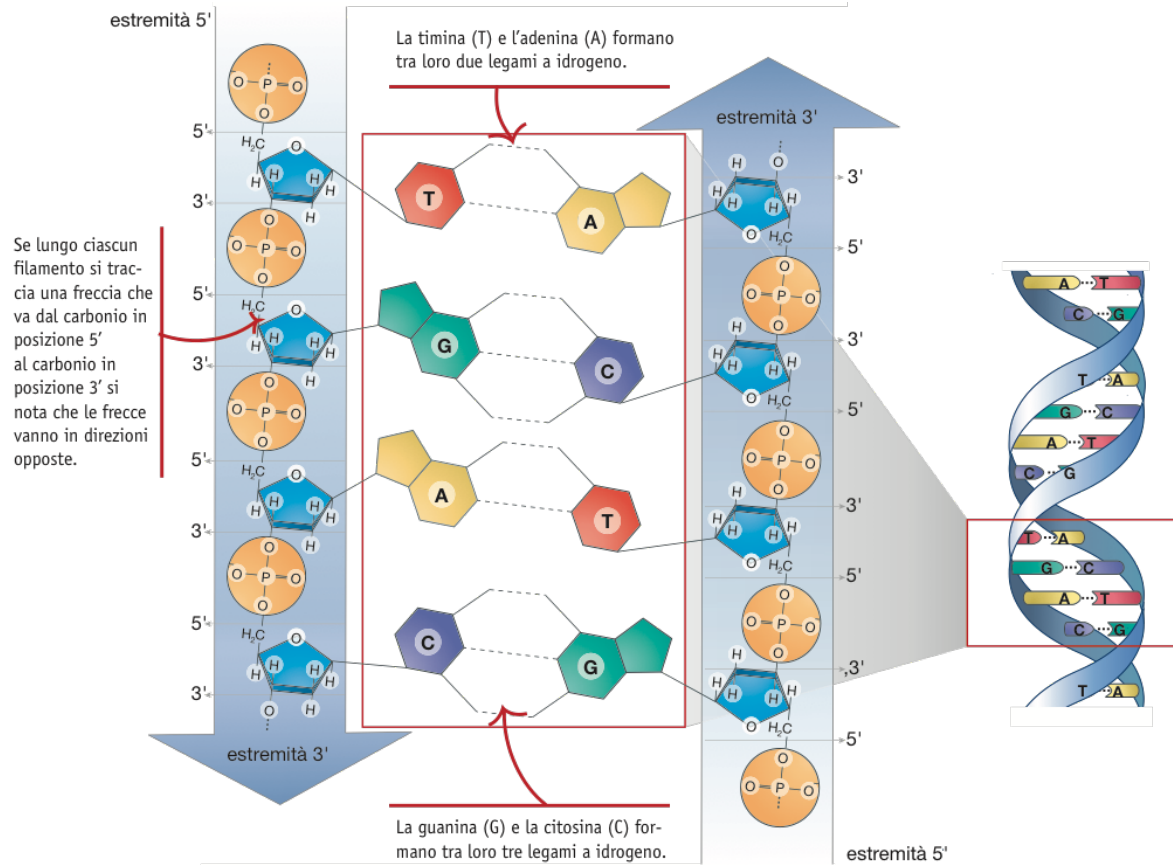
- una molecola di zucchero (desossiribosio);
- un gruppo fosfato;
- una base azotata (adenina, guanina, citosina, TIMINA,)



Acidi nucleici

DNA

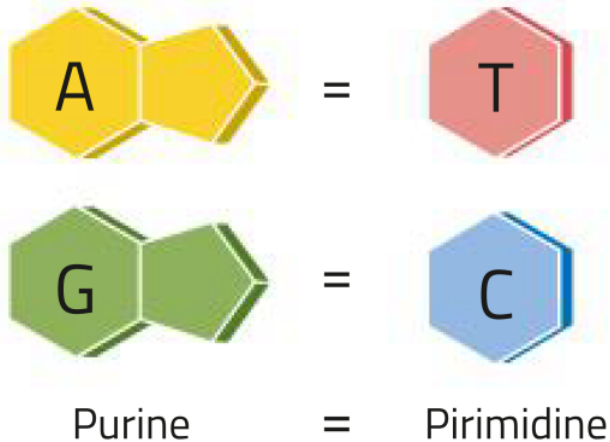
Lo scheletro del polimero del DNA è costituito da un'alternanza di molecole di desossiribosio e di gruppi fosfato, mentre le basi azotate si legano alle molecole di zucchero e sporgono lateralmente rispetto alla catena di desossiribosio e gruppi fosfato. Gli ossigeni ed i fosfati conferiscono polarità



Acidi nucleici

DNA

- Nel DNA la quantità totale delle purine (adenina e guanina) è sempre uguale a quella delle pirimidine (timina e citosina)

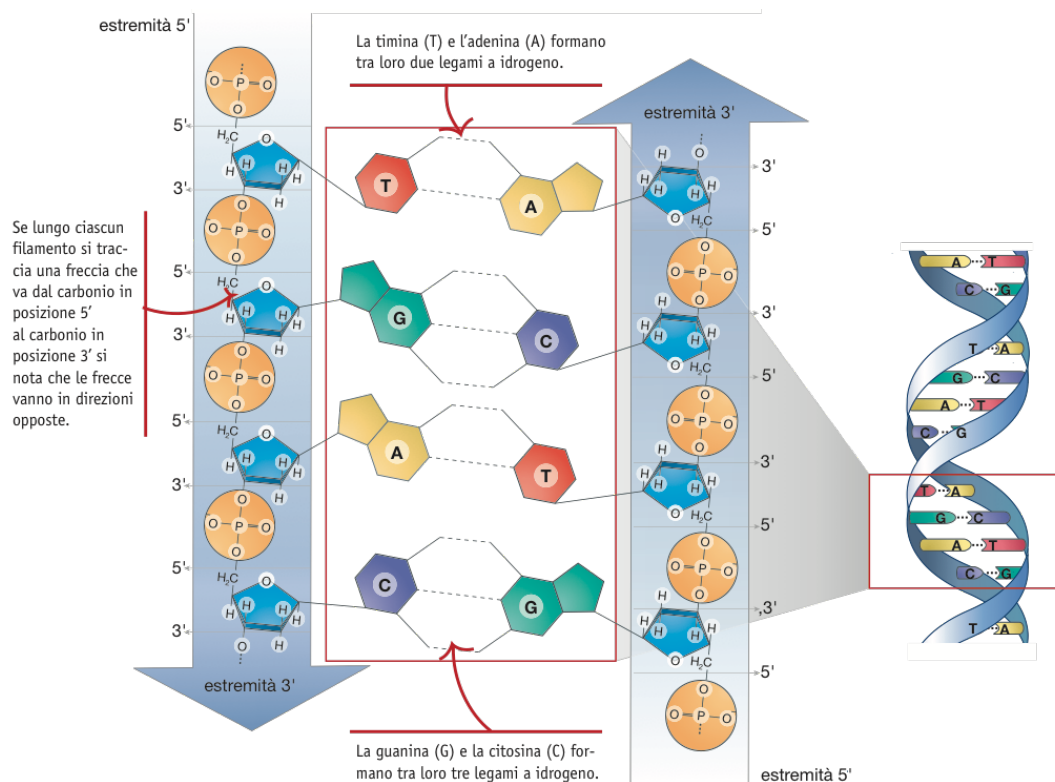


L'appaiamento delle basi avviene sempre e solo tra una purina e una pirimidina a causa della loro struttura chimica: la timina si può unire solo con l'adenina, mentre la guanina si può abbinare solo con la citosina. Questo sistema di appaiamento costituisce la regola della complementarità delle basi.

Acidi nucleici

DNA

- La molecola presenta tre caratteristiche importanti:
- le due catene sono **complementari** e **antiparallele**;
- i legami tra nucleotidi in ciascuna catena sono **legami covalenti**, mentre quelli che uniscono i filamenti appaiati sono **legami a idrogeno**;
- l'elica ha **avvolgimento destrogiro** che crea un **solco maggiore** e un **solco minore**.



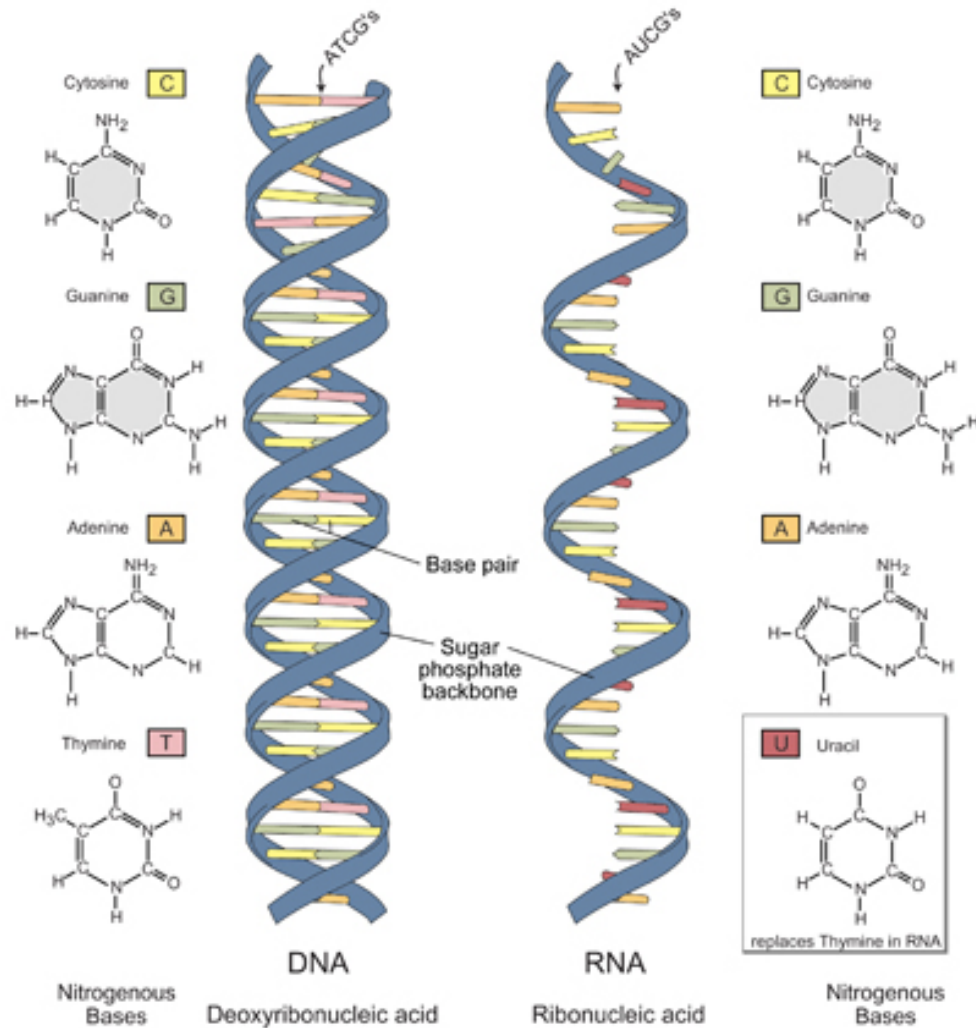
Acidi nucleici

RNA

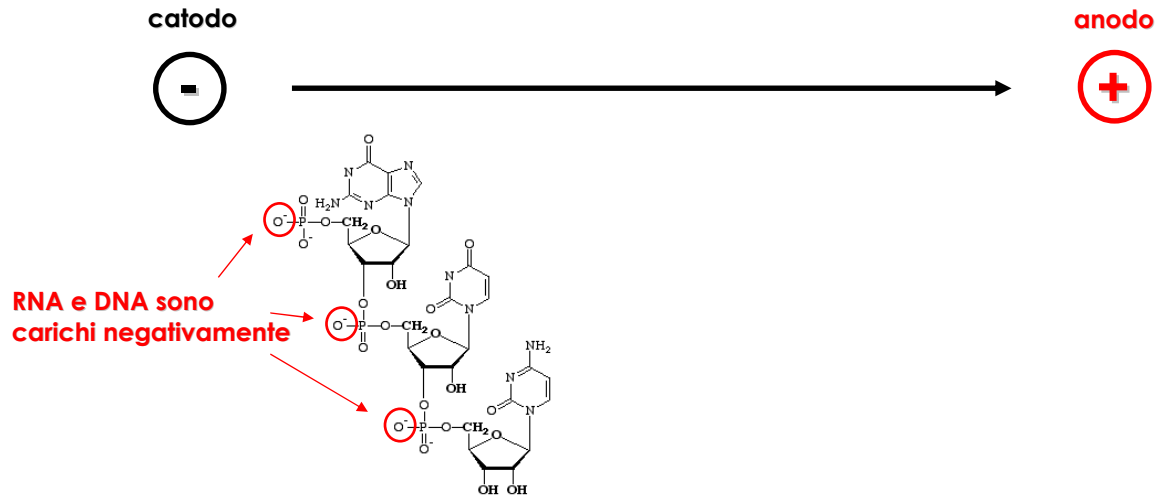
✓ polimero composto da nucleotidi

Ogni nucleotide è formato da:

- una molecola di zucchero (Ribosio);
- un gruppo fosfato;
- una base azotata (adenina, guanina, citosina, URACILE)
- è costituito da una singola catena di nucleotidi, variamente ripiegata, ed esiste in tre forme: mRNA (messaggero), tRNA (transfer) e rRNA (ribosomiale).

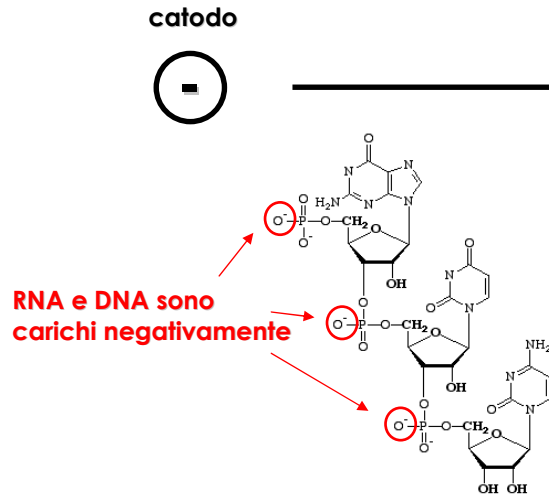


Elettroforesi acidi nucleici



- Molecole di DNA esposte ad un campo elettrico migrano verso l'anodo a causa dei fosfati carichi negativamente lungo lo scheletro del DNA
- Poiché il rapporto carica/massa per tutti i DNA è lo stesso, è la dimensione delle molecole di DNA che determina la velocità di migrazione
- I frammenti di DNA vengono separati su gel di agarosio oppure su gel di poliacrilammide a seconda delle dimensioni

Elettroforesi in agarosio acidi nucleici



- ✓ Amminoacido medio = 110 Da
- ✓ Paio di nucleotidi medio = 649 Da
- ✓ 1 kilobase di DNA = 650 kD
- ✓ 1 kilobase di DNA codifica 333 amminoacidi = 36 kDa

Poliacrilammide usata per
PM tra 5.000 e 200.000 Da

Agarosio pori più grandi, consente la separazione di grandi molecole 0,1-20 kb

Concentrazione di Agarosio: **0.8% : 0.5 – 20 kb**

2% : 0.1 – 3 kb

Elettroforesi in agarosio acidi nucleici

- Si fa sciogliere l'agarosio con tampone TBE. In seguito viene aggiunto bromuro di etidio (colorante fluorescente utilizzato per l'osservazione delle bande di DNA). Si versa il gel sul vassoio adatto alla vaschetta e lo si lascia solidificare
- Poi si inserisce nella cella elettroforetica con una quantità di tampone che lo ricopre, consentendo il caricamento dei campioni nei pozzetti
- Per agevolare l'osservazione dei campioni caricati e seguirne la migrazione elettroforetica si aggiunge al campione un colorante come il blu di bromofenolo. Fra i campioni ci può essere un marker di peso molecolare

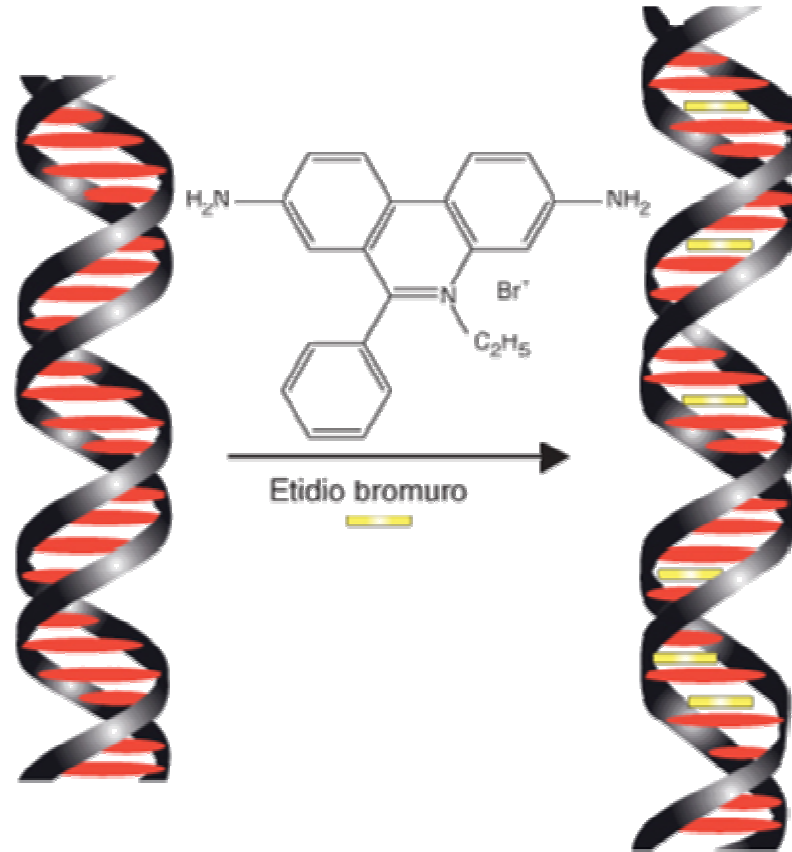
Elettroforesi in agarosio acidi nucleici

- Si applica corrente al voltaggio e per il tempo desiderato
- Alla fine della corsa il gel è osservato al transilluminatore, che eccita il bromuro di etidio utilizzando luce ultravioletta

Il bromuro di etidio, è un colorante fluorescente che assorbe la luce UV a 254 nm e riemette in fluorescenza a 590 nm, dando colore giallo-arancio. ' utile sia per visualizzare, sia per quantificare il campione di DNA: l'intensità della fluorescenza è, infatti, proporzionale alla quantità del campione.

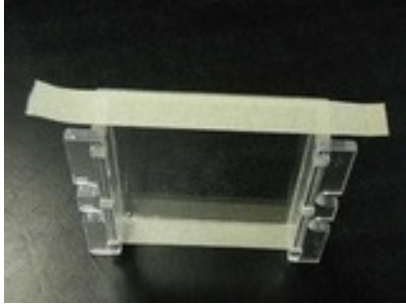
Elettroforesi in agarosio acidi nucleici

Il bromuro di etidio

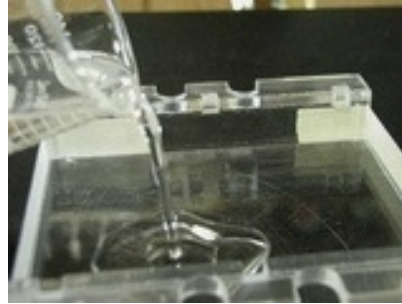


Preparazione del gel di agarosio

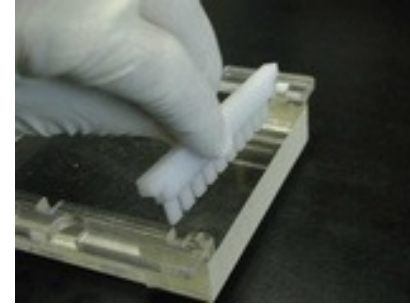
1



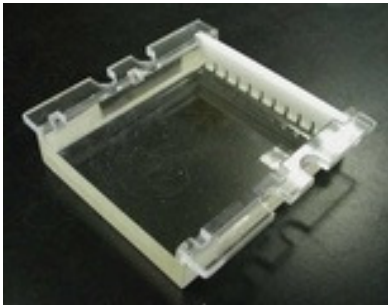
2



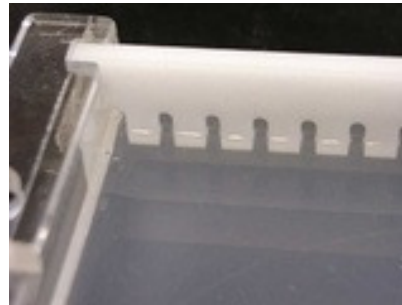
3



4



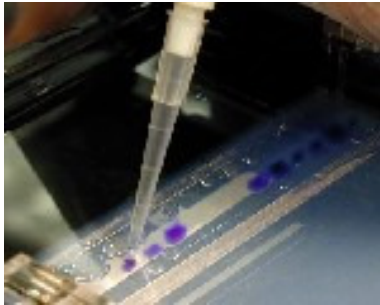
5



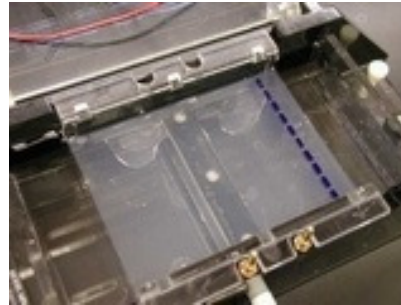
6



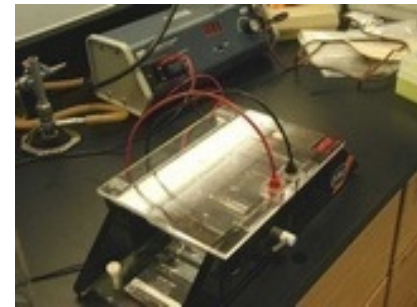
7



8

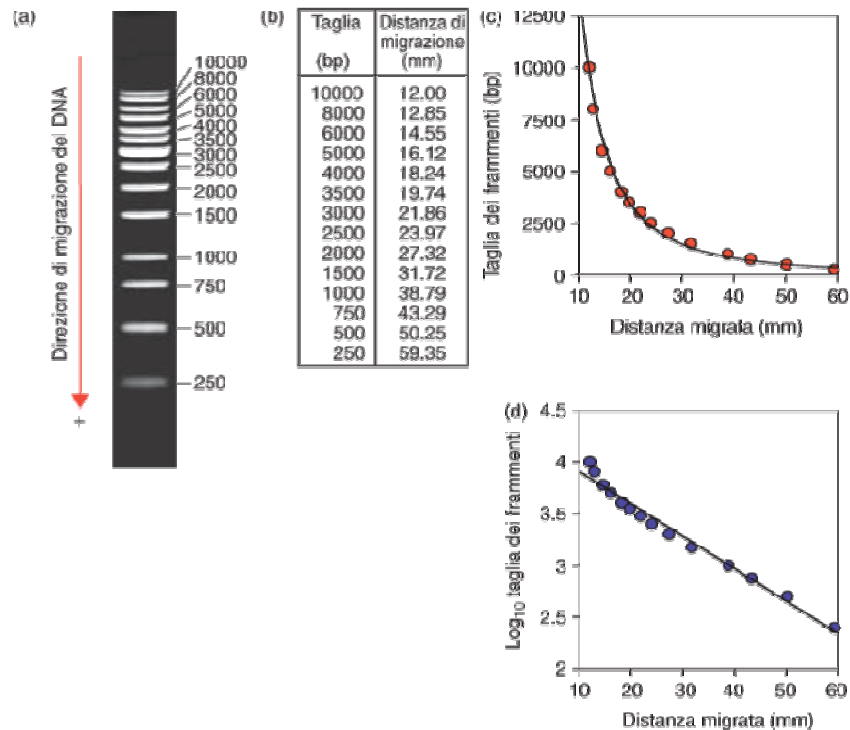


9



Elettroforesi in agarosio acidi nucleici

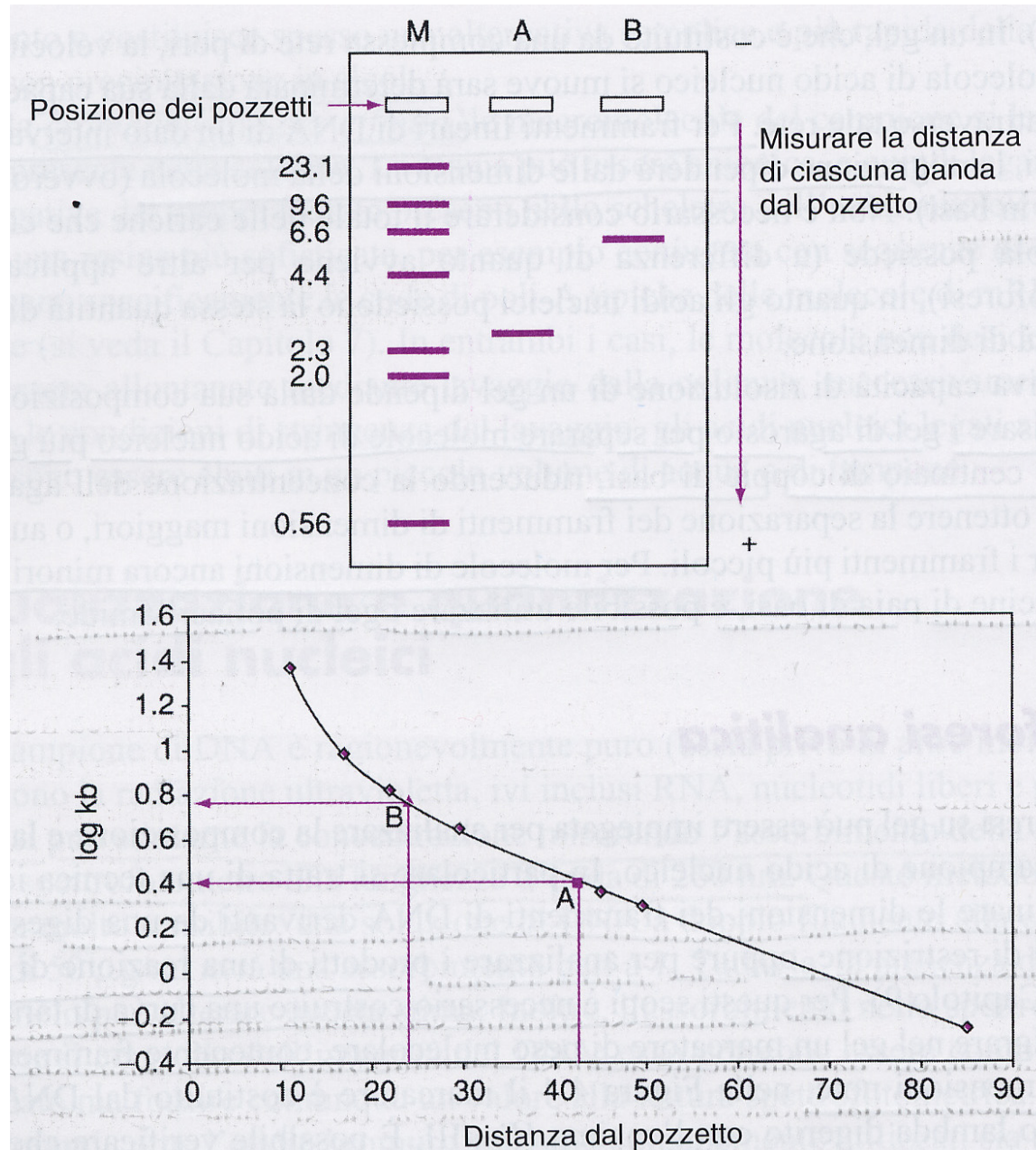
- Per frammenti lineari di DNA e/o RNA la distanza di migrazione è inversamente proporzionale alle dimensioni della molecola (ovvero alla sua lunghezza in basi)



Elettroforesi in agarosio

- Conoscendo la distanza di migrazione di frammenti di dimensione nota (M) posso "interpolare" la lunghezza delle molecole A e B

A=2,5kb
B= 6kb



Elettroforesi in agarosio acidi nucleici

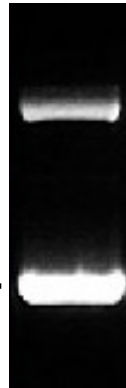
- Non tutte le molecole di DNA sono lineari (es.: plasmidi batterici)

Sebbene le due forme abbiano le stesse dimensioni, esse migreranno in maniera differente

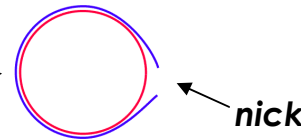
plasmide
superavvolto



pBR322



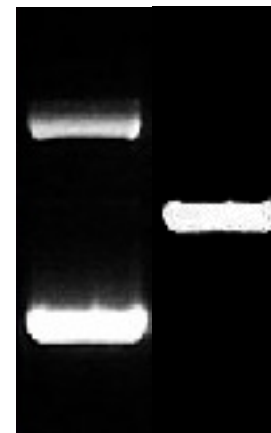
plasmide circolare
“rilassato”



migra più lentamente
rispetto ad un DNA
lineare o superavvolto
della stessa massa

- La forma SUPERAVVOLTA corre più veloce perché è più compatta;
- La forma CIRCOLARE corre più lenta perché è la più “ingombrante” e fa più fatica a muoversi all’interno dei pori del gel a forma
- LINEARE si colloca a metà (la forma lineare è, ad esempio, quella che si ritrova come prodotto nella PCR)

pBR322 pBR322
dopo digestione



plasmide
“linearizzato”

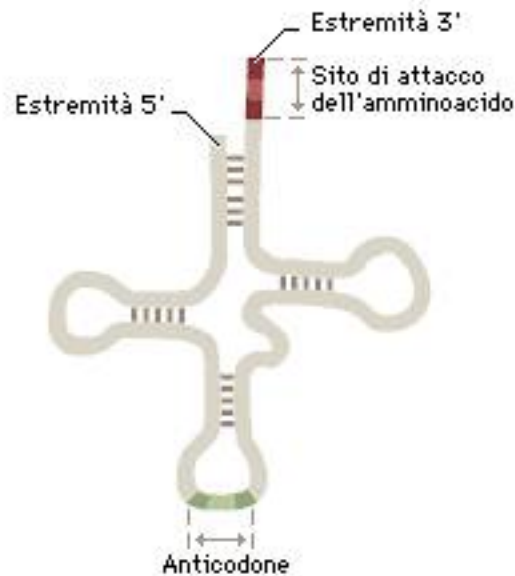
Elettroforesi in agarosio in condizioni denaturanti

- Gli acidi nucleici a singolo filamento (come l'RNA) tendono a formare complesse strutture secondarie, pertanto la loro “corsa elettroforetica” è fortemente influenzata dal modo in cui si ripiegano.
- L'RNA prima di essere separato per elettroforesi deve essere prima denaturato, al fine di mantenere le molecole in forma lineare
- Agenti denaturanti comunemente usati: calore, formaldeide, formammide, urea
-

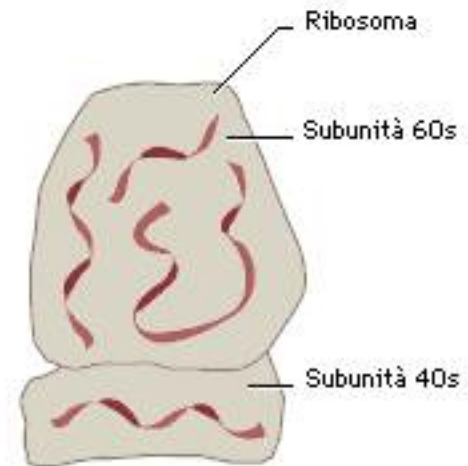
Elettroforesi in agarosio in condizioni denaturanti



**RNA messaggero
(m-RNA)**



**RNA transfer
(t-RNA)**

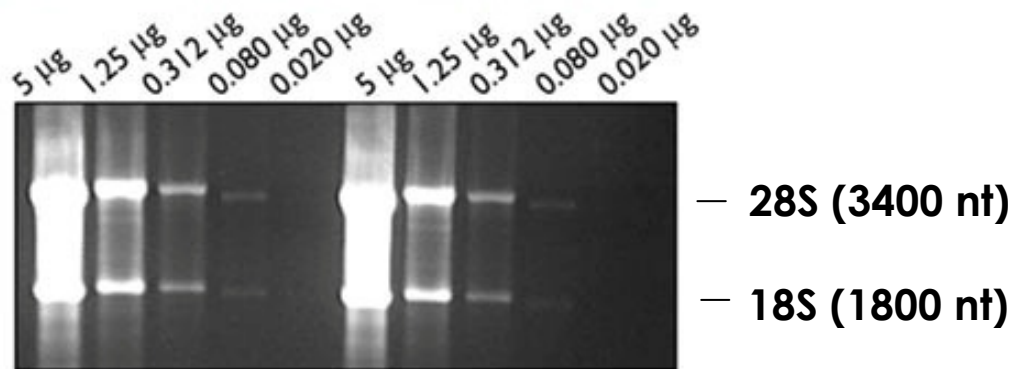


**RNA ribosomiale
(r-RNA)**

Elettroforesi in agarosio in condizioni denaturanti






- Per ottenere una buona separazione dei pesi molecolari durante la corsa nel gel, l'RNA deve essere denaturato, ossia le molecole devono essere liberate sia da appaiamenti con altre molecole sia da strutture secondarie intramolecolari. La denaturazione si ottiene "scottando" (90-95°C) il campione e aggiungendo formaldeide al gel. Anche il loading dye contribuisce alla denaturazione poichè contiene formaldeide e formammide.

RNA Samples in Denaturing Agarose Gel



Elettroforesi in gel di poliacrilammide DNA/RNA

- Separazione di frammenti minori di 1kb
- Permette di separare frammenti che differiscono di una sola base (determinazione della sequenza del DNA)

Acido nucleico	Agarosio	PAGE	Condizioni denaturanti
dsDNA			
ssDNA oligo			
RNA > 1kb (mRNA, rRNA ecc.)			
piccoli RNAs (siRNA, miRNAs ecc.)		